

# **Regulation von stammzelltypischen Genen durch microRNAs**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

**von Dipl.-Biol. Axel Robert Göhring,  
geboren am 05. Juni 1976 in Stuttgart**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. Ralf Mrowka, KIM III, Experimentelle Nephrologie,  
Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. rer. nat Ingrid Hilger, KIM II, Experimentelle Radiologie,  
Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Stefan Wölfl, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie  
Abteilung Pharmazeutische Biologie, Universität Heidelberg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. September 2015**

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
2.1 HINTERGRUND .....	8
2.1.1 <i>Embryonale Stammzellen und Technologie</i> .....	8
2.1.2 <i>Stammzelltypische Gene und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)</i> .....	9
2.1.3 <i>microRNAs und Stammzellen</i> .....	11
2.2 HERLEITUNG DES PROJEKTES .....	13
<b>3. ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
4.1 DESIGN UND KLONIERUNG VON REPORTERGEN-3'UTR-PLASMIDVEKTOREN .....	18
4.2 STABILE TRANSFEKTION VON HEK293-FRT-ZELLEN MITTELS HOMOLOGER REKOMBINATION .....	28
4.3 ÜBERPRÜFUNG DER TRANSFEKTION MIT MICRORNA .....	34
4.4 OPTIMIERUNG DES DUAL-LUZIFERASE-ASSAYS .....	34
4.4.1 <i>Luminometrisches Protokoll und günstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis</i> .....	36
4.4.2 <i>Verdünnungskurven, Temperatur- und Luftsauerstoffempfindlichkeit</i> .....	40
4.4.3 <i>Optimierung des Hochdurchsatzverfahrens</i> .....	41
4.5 MICRORNA-INTERAKTION UND VALIDIERUNG .....	42
4.5.1 <i>Nachweis der chemischen Stabilität der premicroRNA-Bibliothek</i> .....	43
4.5.2 <i>Hochdurchsatzverfahren: microRNA-Interaktion und Validierung</i> .....	44
4.6 BINDUNGSANALYSE DER MICRORNA-335 UND DER MICRORNA-299-3P MIT DER mRNA VON OCT-4 .....	45
4.7 FUNKTIONELLER TEST WIRKSAMER MICRORNAs .....	47
4.7.1 <i>Langzeitmessung für microRNA-Interaktion in physiologischem Reporterassay</i> .....	49
4.7.2 <i>Quantitative RT-PCR und Invasionsassays</i> .....	50
4.7.3 <i>Proteinblots</i> .....	52
4.8 STATISTISCHE ABSICHERUNG DER ERGEBNISSE .....	54

<b>5. ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
5.1 DESIGN UND KLONIERUNG VON REPORTERGEN-3'UTR-PLASMIDVEKTOREN.....	55
5.2 STABILE TRANSFEKTION VON HEK293-FRT-ZELLEN MITTELS HOMOLOGER REKOMBINATION .....	55
5.3 ÜBERPRÜFUNG DER TRANSFEKTION MIT MICRORNA.....	55
5.4 OPTIMIERUNG DES DUAL-LUZIFERASE-ASSAYS .....	57
5.4.1 Luminometrisches Protokoll und günstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis .....	57
5.4.2 Verdünnungskurven, Temperatur- und Luftsauerstoffempfindlichkeit.....	59
5.4.3 Kurze Gesamtmesszeit im Hochdurchsatzverfahren und Auswahl eines günstigen Messintervalls .....	62
5.5 miRNA-INTERAKTION UND VALIDIERUNG .....	63
5.5.1 Nachweis der chemischen Stabilität der microRNA-Bibliothek.....	63
5.5.2 Hochdurchsatzverfahren: microRNA-Interaktion und Validierung .....	64
5.6 BINDUNGSANALYSE DER MICRORNA-335 UND DER MICRORNA-299-3P MIT DER mRNA VON OCT-4.....	68
5.7 FUNKTIONELLER TEST WIRKSAMER MICRORNAS .....	69
5.7.1 Langzeitmessung für microRNA-Interaktion mit physiologischem Reportersystem.....	69
5.7.2 Quantitative RT-PCR und Invasionsassay .....	71
5.7.3 Proteinblot.....	75
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>77</b>
6.1 ERGEBNISSE .....	77
6.1.1 Oct-4, Sox-2 und Nanog reprimierende microRNAs.....	77
6.1.2 Stammzellgene und Tumorzellen .....	79
6.1.3 Die microRNAs-335 und -299-3p als Onkomir und Tumorsuppressor .....	80
6.1.4 Stammzelltypische microRNAs, native und induzierte Stammzellen .....	83
6.2 METHODIK .....	85
<b>7. SCHLÜßFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....</b>	<b>87</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>101</b>
9.1 DATEN .....	101
9.1.1 Klonierung .....	101
9.1.2 Bindungsanalyse der miRNA-Interaktion mit Oct-4 .....	102

9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	107
9.3 TABELLENVERZEICHNIS.....	109
9.4 DANKSAGUNGEN.....	110
9.5 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	111

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
AGTR-1	Angiotensinrezeptor 1
AGTR-2	Angiotensinrezeptor 2
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriophosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c-myc	cellular myelocytomatosis oncogene (zelluläres Myelocytomato-se-Onkogen)
CoA	Coenzym A
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cre	cyclization recombination
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESZ	embryonale Stammzelle
FKS	Fötales Kälber-Serum
FRT	Flippase recognition site
g	Gramm
H-Test	Kruskal-Wallis-Test
HEK 293	Human embryonal kidney 293
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTS	High throughput screening (Hochdurchsatzverfahren)
iPS	induzierte pluripotente Stammzelle
Klf-4	Krüppel-like factor 4
l	Liter
LB	Lysogeny broth
loxP	locus of X-over of P1
lin-28	cell lineage abnormal 28

MCS	Multi cloning site
Min.	Minute
ml	Milliter
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
miR, miRNA	microRNA
nESZ	native embryonale Stammzelle
NANOG	(von Tír na nÓg, gäl. „Land der ewigen Jugend“)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nt	Nukleotide
Oct-4 (POU5F1)	Octamer binding transcription factor 4 (Pit-Oct-Unc-domain class 5 transcription factor 1)
pmol	Pikomol
premiRNA	microRNA-Präkursor
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Sek.	Sekunde
SF	Standardfehler (engl. standard error of mean, sem)
Sox-2	Sex determining region Y (SRY)- box 2
SRH-Test	Scheirer-Ray-Hare-Test
SZ	Stammzelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
(3', 5')-UTR	untranslatierte Region von mRNA (am 3'- oder 5'-Ende)

## 1. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren existiert die Möglichkeit, aus differenzierten Fibroblasten und anderen Zellen mit Hilfe von nur vier oder weniger Schlüsselgenen induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) zu erzeugen. Seither hat sich die Reprogrammierung von differenzierten somatischen Zellen zu einem wachsenden Forschungsfeld entwickelt. Da die genetische Regulation für die Reprogrammierung von Zellen essentiell ist, besteht großes Interesse daran, die zelluläre Kontrolle von Pluripotenzgenen zu verstehen.

In eukaryontischen Zellen existieren mehrere aufeinanderfolgende Stufen der Genregulation. Die posttranskriptionellen Mechanismen verstärken oder vermindern die Wirkung von mRNA. Die microRNAs regulieren die Genexpression durch Wechselwirkung mit 3'UTR-Sequenzen von mRNA herunter. Da zahlreiche microRNA-Spezies die Expression einer großen Zahl von Proteingenen beeinflussen, ist es sinnvoll, die Interaktion von microRNA und mRNA spezieller Gene mit Hilfe eines Hochdurchsatzverfahrens zu analysieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Regulation der stammzelltypischen Gene für die Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog und Sox-2 durch microRNAs aus einer Bibliothek untersucht. Dazu wurden Reporter-genkonstrukte durch homologe Rekombination stabil in eine humane Zelllinie transfiziert. Das Transgen bestand aus der entsprechenden 3'UTR gekoppelt mit dem Gen für *Renilla*-Luziferase.

Nach Sicherstellung der erfolgreichen einmaligen und vollständigen Integration des Transgens wurden die microRNAs in die Zellen transfiziert und die Wechselwirkung mit den 3'UTRs über die Luziferaseaktivität maschinell gemessen. Für jedes Stammzellgen konnten einige teils hochwirksame microRNAs identifiziert werden.

Eine luminometrische Langzeitmessung in Zellen mit einem alternativen Luziferase-Reportersystem bestätigt die Ergebnisse für den Pluripotenzfaktor Oct-4. Um die bioinformatisch vorhergesagte Hybridisierungsstelle der für Oct-4 gefundenen RNA-Moleküle zu überprüfen, wurde die natürliche 3'UTR-Sequenz mutiert und eine Bindungsanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich komplementär zu den Ergebnissen der Messung mit der Wildtyp-Sequenz keine Wirkung der microRNA mehr.

Um die physiologische Funktion der wirksamen RNA-Moleküle in Oct-4-exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden Invasionsexperimente mit Mammakarzinom-abgeleiteten Zellen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Repression von Oct-4 zu einer verringerten Invasivität



der Karzinomzellen in Matrigel führte. Im Zusammenhang damit zeigte sich im Proteinblot eine verringerte Expression von Oct-4 in den Proben, die mit wirksamen microRNAs transfiziert wurden.

English version:

For several years it is possible to generate induced pluripotent stem cells (iPS) from differentiated fibroblasts or other cells by using just four or less stem cell key genes. Since then the reprogramming of differentiated adult somatic cells has become a growing field of research. Because the genetic regulation is essential for reprogramming of cells, understanding the control of pluripotency genes is of great interest.

In eukaryotic cells exist several successive levels of gene regulation exist in eukaryotic cells. The posttranscriptional mechanisms enhance or decrease the effect of messenger RNA. The microRNAs downregulate the gene expression by interaction with 3'UTR sequences of mRNA. Due to the fact, that many microRNA species impair the expression of a great number of protein genes, it is useful to analyze the interaction of microRNAs and special mRNAs with the help of a high throughput assay.

In this PhD thesis, the control of the stem cell typic transcription factor genes Oct-4, Nanog and Sox-2 by 477 human microRNAs from a library was investigated. For this purpose, reporter gene constructs consisting of the transcript's 3' UTR linked to the gene sequence of Renilla luciferase were transfected stably into a human cell line by homologous recombination. After having tested the successful singular and complete insertion of the construct the microRNAs were transfected into the cells, and the interaction with the 3' UTR was measured by luciferase activity. The downregulation of the reporter enzyme indicated effective microRNAs for every stem cell gene. A longtime recording of luciferase signal in cells with an alternative lentiviral reporter system confirmed the results for the pluripotency factor Oct-4. To analyze the hybridization site of identified microRNAs in the 3' UTR of Oct-4 a mutation assay was performed. In contrary to wild type sequence, the mutated 3' UTR did not show a decreased reporter gene signal. To analyze physiological functions of identified microRNA molecules in Oct-4 expressing cells, invasion assays with breast cancer cells were performed. It could be demonstrated that a repression of Oct-4 lead to a decreased invasion of the carcinoma cells into matrigel. In context with this finding, a decreased expression of Oct-4 in cells transfected with effective microRNAs could be observed in Western blot analysis.

## 2. Einleitung

### 2.1 Hintergrund

#### 2.1.1 Embryonale Stammzellen und Technologie

Native embryonale Stammzellen (nESZ) von Säugetieren sind totipotent und können daher potentiell einen kompletten Organismus aufbauen (Knoepfler et al. 2007). Ein menschlicher Embryo besteht während der Phase des Maulbeerkeims (Morula) ausschließlich aus nESZ, die bei Eintritt in die Phase des Blasenkeims (Blastula) in einen pluripotenten Zustand übergehen. Pluripotenz bedeutet, dass sie sich zu jedem Zelltyp der drei Keimblätter (Ulloa-Montoya et al., 2005) und der Keimbahn differenzieren, aber keinen vollständigen Körper mehr bilden können.

Embryonale Stammzellen (ESZ) teilen sich *in vivo* und *in vitro* asymmetrisch; es entstehen zwei Tochterzellen, von denen eine ihre Stammzellcharakteristik („stemness“) bewahrt, während die andere sich in Richtung einer Vorläuferzelle entwickelt.

ESZ konnten erstmals aus der inneren Zellmasse des Blasenkeims der Maus isoliert werden (Martin, 1981). Später gelang die Kultivierung humaner Stammzellen (Thomson, 1998). *In vitro* neigen ESZ zur spontanen Differenzierung, was durch Gabe verschiedener Wirkstoffe verhindert werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, die Zellen theoretisch unbegrenzt bei Erhalt ihrer pluripotenten Eigenschaften zu kultivieren (Ying et al., 2003).

Embryonale Stammzellen besitzen möglicherweise das Potential, im Rahmen medizinischer Therapien degenerierte Zellen oder Gewebe eines Organismus zu ersetzen. Als mögliche Anwendung wird vorrangig die Behandlung von degenerativen oder posttraumatischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, M. Parkinson, Arthrose und chronischen Lähmungen erwogen. An Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass sich implantierte Stammzellen in Embryos physiologisch in den Organismus einfügen und funktionelle Gewebe bilden. Humane ESZ konnten *in vitro* in verschiedene Zelltypen ausdifferenziert werden, unter anderem in neurale (Zhang et al., 2001) oder mesenchymale Vorläufer (Arpornmaeklong et al., 2009). Am menschlichen Patienten werden seit 2009 in wenigen Fällen ESZ zur experimentellen Therapie genutzt.

Die Nutzung von ESZ zu medizinischen Zwecken ist allerdings mit biologischen und juristisch-ethischen Problemen behaftet: Zu ihrer Gewinnung müssten Embryonen, die zum Beispiel für die *in-vitro*-Fertilisation gewonnen wurden, getötet werden, was in vielen Ländern wie der Bundesrepublik Deutschland verboten ist (Gerichtshof der EU, Pressemitteilung 112/11). Darüber

hinaus stünde selbst ohne diese juristischen Barrieren aufgrund der geringen Größe eines humanen Embryos und der schwierigen Beschaffung kaum genügend Zellmaterial zur Verfügung, um größere Gewebeschäden eines Patienten zu behandeln.

Alternativ zu toti- und pluripotenten embryonalen Stammzellen wird die Nutzung von Zellen postembryonaler Herkunft wie neonataler oder adulter SZ erwogen, die allerdings meist nur ein keimblattabhängiges Differenzierungspotential besitzen. So stellen beispielsweise aus Knochenmark isolierte adulte Stammzellen einen mesenchymalen Vorläufertyp dar, der sich nur zu Zellen des Stütz- und Bindegewebes wie Chondrozyten (Kalwitz et al., 2011) oder Adipozyten (Song et al., 2011) entwickeln kann. Außerdem konnte an gelähmten Mäusen gezeigt werden, dass neuronale Stammzellen einen Rückenmarkschaden überbrücken und die Paralyse rückgängig machen können (Cummings, 2005).

Um die Beschränkungen embryonaler und neonataler Stammzellen zu umgehen, bieten sich induzierte SZ an, die aus differenzierten Körperzellen des Patienten gewonnen werden können.

### **2.1.2 Stammzelltypische Gene und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)**

2006 und 2007 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Shinya Yamanaka aus Kyoto die Ergebnisse ihres Projektes zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen aus differenzierten Zellen des Modellorganismus Maus (Takahashi und Yamanaka, 2006) bzw. des Menschen (Takahashi et al., 2007). Dabei wurden Hautfibroblasten einer Maus bzw. einer 31-jährigen Spenderin mittels viraler Transfektion von nur vier Transkriptionsfaktoren (Oct-4, Sox-2, Klf-4 und c-myc, *OSKM*) in pluripotente Stammzellen umgewandelt. Die erfolgreiche Reprogrammierung konnte durch den Nachweis der Expression stammzelltypischer Proteine und Teratombildung überprüft werden. Alternativ wurden iPS mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2, Nanog und lin-28 (OSNL) ohne Protoonkogene wie c-myc von der Arbeitsgruppe um James Thomson erzeugt (Yu et al., 2007).

Die einzelnen Transkriptionsfaktoren sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden.

Der Oktamer-bindende Faktor 4, Oct-4 (auch Oct-3 oder POU5F1) ist ein Transkriptionsfaktor aus der POU-Familie. Oct-4 ist somit ein Protein, das über Bindung an den Promotorbereich zahlreicher anderer Gene wie *Rcor2*, *Esrrb* und *Phc1* die Transkription dieser katalysiert (Takeda et al., 1992; Loh et al., 2006). Oct-4 wird nur in ESZ und Keimzellen des ausgewachsenen Organismus hergestellt. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass eine geringe Expression von Oct-4

die Lebensfähigkeit eines Embryos stark herabsetzt und die Umwandlung von totipotenten Stammzellen in differenzierte trophoblastische Zellen bewirkt (Boiani, 2002). Daher wurde das Protein als potentieller Reprogrammierungsfaktor angesehen.

Sox-2 (sex determining region Y/ SRY- box 2) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der in embryonalen Stammzellen, aber auch in Vorläuferzellen adulter Organismen, z.B. in neuronalen SZ, aktiv ist (Collignon et al., 1996; Komitova und Eriksson, 2004). Möglicherweise kontrolliert Sox-2 die Expression von Oct-4 (Masui et al., 2007).

c-myc (zelluläres Myelocytomatose-Onkogen) ist seit längerem als Protoonkogen bekannt, was bedeutet, dass es im Falle einer Mutation oder geringeren Expression die Entartung einer Zelle bewirken kann (Piccoli et al., 1984). Es kann außerdem die Expression aller in einer Stammzelle aktiven Gene erhöhen (Nie et al., 2012).

Klf-4 (Krüppel-like factor 4; auch gut-enriched Krüppel-like factor, GCLF) ist ein Transkriptionsfaktor, der gemeinsam mit  $\beta$ -Catenin die Expression einer Telomerase-Untereinheit reguliert (Hoffmeyer et al., 2012). Klf-4 wirkt zusammen in einem Netzwerk mit anderen Faktoren bei der Aufrechterhaltung des Stammzellstatus (Hall et al., 2009; Zhang et al., 2010)

Nanog gehört zu den Homöobox-/Hox-Genen und erhielt seinen Namen nach dem sagenhaften „Land der ewigen Jugend“ in der irischen Literatur. Der Transkriptionsfaktor ist in ein zelluläres Regulations-Netzwerk eingebunden, das die Selbsterneuerung von Stammzellen steuert (Chambers et al., 2003; Darr et al., 2006). Allerdings ist der Einsatz von Oct-4 und/oder Sox-2 zur Erzeugung von induzierten Stammzellen ausreichend (Pereira et al., 2008; Kim et al., 2009).

Die Erzeugung von induzierten pluripotenten Stammzellen nach Yamanaka et al. erfolgte mit viralen Vektoren und ist zudem ineffizient. Daher wurden zahlreiche Versuche unternommen, iPS mit alternativen Methoden zu erzeugen.

So wurden iPS mit Hilfe anderer humaner Zelltypen aus fötaler, neonataler und adulter Quelle hergestellt (Park et al., 2007), und die Stammzellfaktoren mit nicht-integrierenden Adenoviren (Stadtfield et al., 2008) oder DNA-Plasmiden transfiziert (Okita et al., 2008). Außerdem konnten induzierte pluripotente Stammzellen mit Hilfe von rekombinanten Proteinen („piPS“) (Zhou et al., 2009), mRNAs (Warren et al., 2010) und microRNAs (Anokye-Danso et al., 2011; Miyoshi et al., 2011) hergestellt werden. Die Unterstützung der Reprogrammierung mit microRNAs (Yang et al., 2011; Lin und Ying, 2013) und kleinen Molekülen wie Natriumbutytrat oder Benzamidderivaten (McMillan et al., 2013) wurde untersucht.

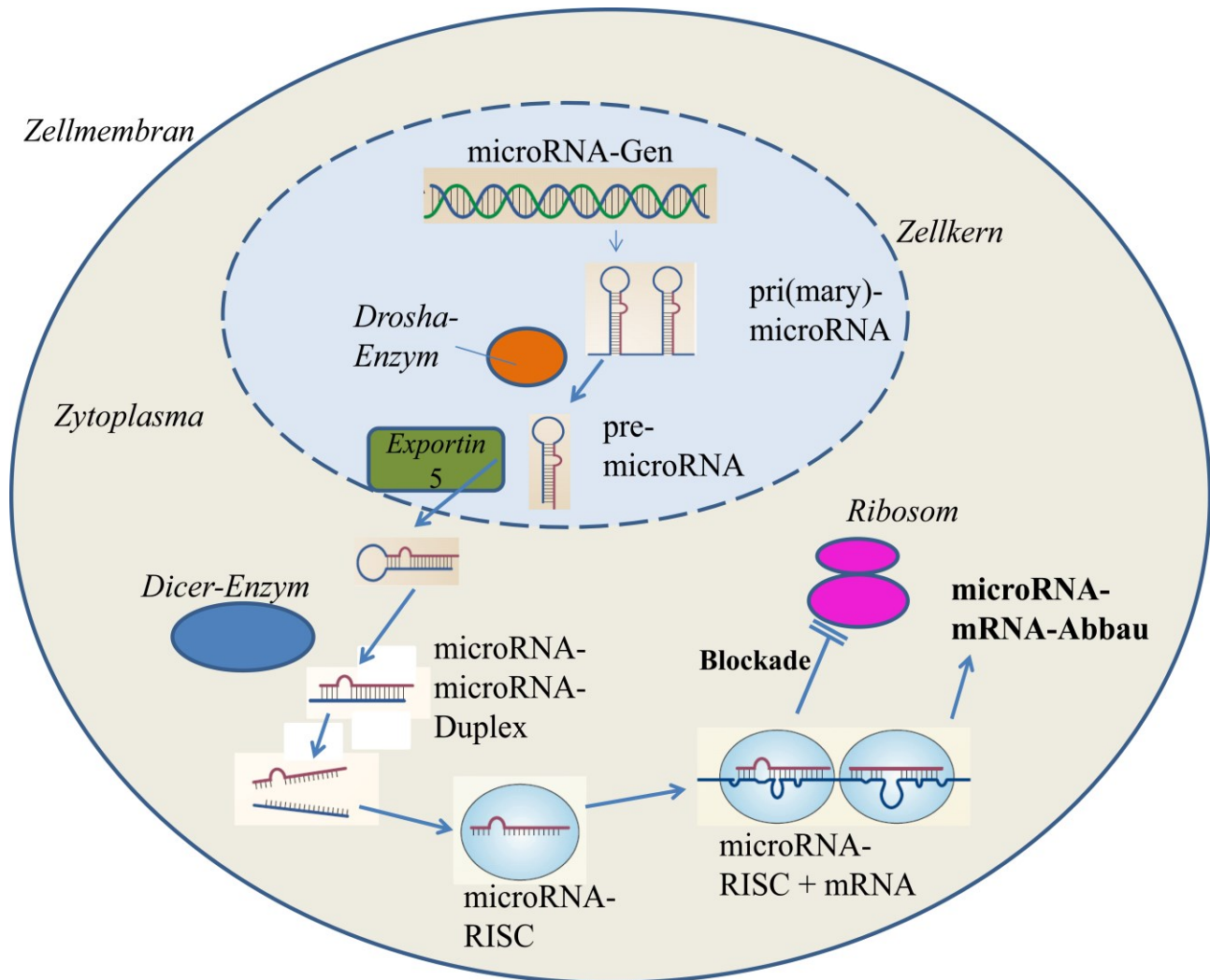
Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Generierung von Stammzellen aus adulten Körperzellen mit einer verringerten Anzahl von Faktoren gelingt: Oct-4 mit Klf-4 oder c-myc (Kim et al., 2008), Oct-4 mit Sox-2 (Huangfu et al., 2008) und sogar nur mit Oct-4 (Pereira et al., 2008).

### **2.1.3 microRNAs und Stammzellen**

Die für die Regulation der Genexpression wichtigen microRNAs wurden im Jahre 1993 entdeckt (Lee et al., 1993) und sind evolutionär sehr alte, kurze, meist 21-23 Basen umfassende einsträngige nicht-kodierende Nukleotidsequenzen, die sowohl in Wirbellosen wie auch Wirbeltieren hochkonserviert vorkommen (Lagos-Quintana, 2001). Sie hybridisieren partiell mit der 3' untranslatierten Region einer mRNA (Lai, 2002) und blockieren so die Translation (Zeng et al., 2002) oder bewirken bei vollständiger Hybridisierung ähnlich der RNA-Interferenz (RNAi) den Abbau der mRNA (Yekta et al., 2004; Allen et al., 2005; Guo et al., 2010). Daher wurde vermutet, daß microRNAs als molekularbiologische Feinregulatoren agieren, die die Expression eines Gens nur teilweise reprimieren.

In der zentralen Datenbank für microRNAs, miRBase, wurden im Jahre 2011 17.000 verschiedene reife microRNA-Sequenzen von 140 Spezies gelistet (Kozomara und Griffiths-Jones, 2010); kommerziell waren im Jahre 2012 über 1.200 reife humane microRNAs als Vorläufermoleküle erhältlich (Ambion, life technologies). Nach informatischen Vorhersagen könnten bis zu 30% aller menschlichen Gene microRNA-reguliert werden (Lewis et al., 2005).

Die DNA-Vorlagen der microRNAs liegen entweder in Proteingenen oder in eigenen Sequenzen des Genoms (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2003). Die Ablesung der DNA erfolgt durch die RNA-Polymerase II (Lee et al., 2004). Das primäre Transkript bildet eine Stammschleife, wird pri-miRNA genannt und hat eine Länge von 500 bis 3.000 Nukleotiden (Lee, 2002). Die RNase III Drosha (gemeinsam mit dem Cofaktor Pasha) prozessiert die pri-miRNA im Kern zu der 70-80 Nukleotide langen Vorläufer-microRNA (pre-miRNA) (Han, 2004). Nach dem Export in das Zytoplasma wird die pre-miRNA vom RNase III-Dicer-Komplex weiter geschnitten und so eine doppelsträngige Duplex-miRNA produziert. Der Doppelstrang wird getrennt und die Leitsequenz, die reife microRNA, in einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) ähnlich dem RISC (RNA-induced silencing complex) der RNA-Interferenz aufgenommen (Gregory et al., 2005). Der RNP-miRNA-Komplex hybridisiert mit einer Ziel-mRNA und vermittelt so den Abbau der mRNA oder die Translations-Blockade (Kim and Nam, 2006).



### Abbildung 2.1 Biogenese der microRNA.

Die RNA-Polymerase II produziert nach der DNA-Vorlage das Primärtranskript pri-microRNA, das von dem Enzym Drosha mit seinem Cofaktor Pasha/DGCR8 zur pre-miRNA weiterprozessiert wird. Durch Translokations-proteine wird die pre-microRNA aus dem Kern exportiert und im Zytoplasma vom Enzym Dicer zur doppelsträngigen Duplex-miRNA geschnitten. Die Leitsequenz der Duplex wird vom Gegenstrang abgetrennt und als reife microRNA mit dem miRNP-Komplex RISC vereint. RISC vermittelt nun die vollständige oder teilweise Hybridisierung mit der Zielsequenz auf einer mRNA. Dadurch wird die Translation des Transkriptes am Ribosom blockiert oder, mit der doppelsträngigen RNA als Signal die mRNA abgebaut (verändert nach <http://www.sigmaaldrich.com>).

Die microRNAs stellen ein wachsendes Forschungsfeld dar, da viele Zelltypen spezifisch über diese kleinen Nukleotide reguliert werden. In humanen embryonalen Stammzellen wie auch in induzierten pluripotenten Stammzellen wurden einige miRNA-Spezies nachgewiesen, die mit den stammzelltypischen Genen Oct-4, Nanog, Sox-2, lin-28 und c-myc in regulatorischer Wechselwirkung stehen. Die miR-Cluster 290-295 (Lichner et al., 2011; Lüningschrör et al., 2012), 302 und 17-92 (Lee et al., 2008), wurden dabei als den Stammzellcharakter erhaltende RNAs identifiziert und sind daher für die Herstellung von iPS interessant.

Diese microRNAs werden von den Stammzellgenen reguliert oder regulieren diese. Die Expression der miR-302 beispielsweise wird von den Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Sox-2 initiiert; die reife microRNA interagiert mit Zyklin D1 (Greer Card et al., 2008). Die microRNA-367 hingegen aktiviert die Transkription von Oct-4 (Anokye-Danso et al., 2011).; die microRNAs let-7, mir-125, mir-9, und mir-30 aktiviert die Expression von lin-28 (Zhong et al., 2010).

Die humane microRNA-145 und der Cluster miRNA-290 wurden als reprimierend für die Gene Oct-4, Sox-2 und Klf-4 und differenzierungsfördernd beschrieben (Sinkkonen et al., 2008; Xu et al., 2009; Jain et al., 2012). Da einige maligne Tumorarten stammzellähnliche Zellen enthalten, die sich gegenüber Chemotherapeutika als resistent erwiesen haben (Domingo-Domenech et al., 2012), könnten reprimierende microRNAs in Zukunft als therapeutische Ziele oder Agenzien dienen (Peng, 2012).

## 2.2 Herleitung des Projektes

Seit der Veröffentlichung der Ergebnisse zur Herstellung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen aus differenzierten Fibroblasten von Yamanaka et al. 2007 hat sich die Charakterisierung der iPSe für eine mögliche therapeutische Nutzung zu einem wichtigen Forschungsfeld entwickelt. Neben stammzelltypischen Genen wurde eine Reihe von microRNAs, die die „stemness“ von iPSen aufrechterhalten, entdeckt (s.2.1). Die Anzahl beschriebener differenzierungsfördernder, die typischen Stammzellgene herunter-regulierender microRNAs ist bislang gering.

Zur Herstellung von Geweben und Organen aus iPS werden Differenzierungsfaktoren benötigt, die außerdem auch als Wirkstoffe gegen Krebsstammzellen dienen könnten. Daher ist es interessant, in einem Assay systematisch nach microRNAs zu suchen, die die Expression stammzelltypischer Gene verringern.

In dieser Dissertation sollten daher zelluläre Konstrukte hergestellt werden, die 3'UTR-Sequenzen von Oct-4, Nanog, und Sox-2 enthalten. Diese Sequenzen interagieren mit microRNAs und ermöglichen so über ein Reportersystem eine Auslesemöglichkeit.

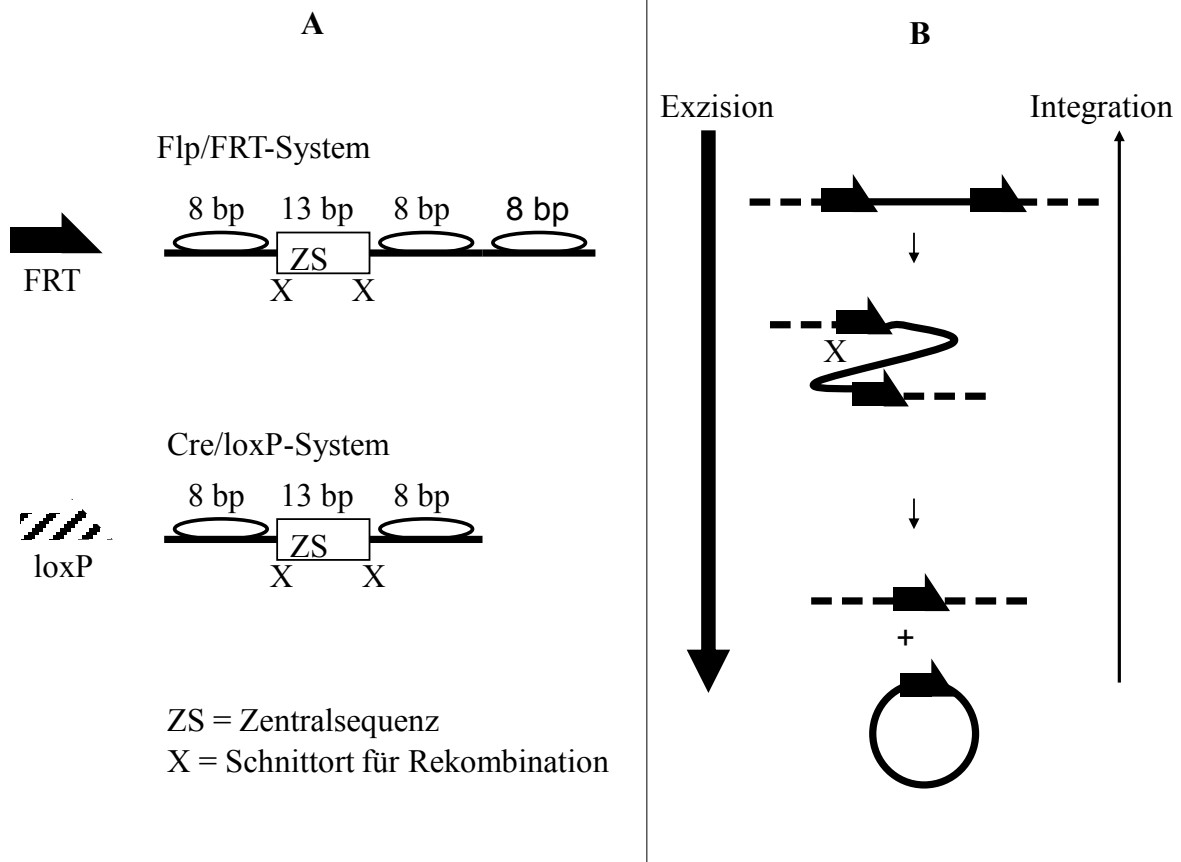
Vektoren mit Reporter-gen-UTR-Konstrukten können transient (Anton et al., 2011) oder stabil in humane Zellen überführt werden. Die stabile Transfektionsmethode bietet dabei einige Vorteile: Es ist sichergestellt, dass bei gleich bleibenden Kultivierungsbedingungen wegen des im Genom aufgenommenen DNA-Transgens eine konstante Menge an mRNA-Transkripten produziert wird und so keine zellinternen Schwankungen des Zielmoleküls auftreten können, was die Vergleichbarkeit zu Kontrollexperimenten gewährleistet. Zudem können konservierte transgene

Zellen jederzeit in weiteren Assays unter gleichen Voraussetzungen eingesetzt werden.

Um Transgene stabil in das Genom von Zielzellen zu integrieren, existieren zwei Möglichkeiten: die klassische Methode sieht vor, ein linearisiertes Vektorplasmid z.B. über Lipofektion in die Zellen einzubringen, das über bislang nicht verstandene Mechanismen in die Kern-DNA einligiert wird, was aber das Risiko von teilweisen oder mehrfachen Insertionen birgt (Mülhardt, 2009).

Eine neuere Methode nutzt eine rekombinaseabhängige ortsspezifische homologe Rekombination des Bakteriophagen P1, das Cre/loxP-System (Hoess et al., 1982). Cre („cyclization recombination“ oder „causes recombination“) ist eine Rekombinase, die eine bestimmte DNA-Sequenz, loxP (locus of X-over of P1), erkennt. Zwischen zwei loxP-Sequenzen liegende DNA-Abschnitte werden ausgeschnitten und zyklisiert oder invertiert. Die ausgeschnittene Sequenz kann von Cre wieder eingebaut werden (siehe Abb. 2.2). Daher wird Cre/loxP meist für das gezielte Entfernen bestimmter Gene genutzt, um Knockout-Organismen zu erzeugen (Liu et al., 2000). Ein ähnliches Rekombinationssystem ist das Flp/FRT-System aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Gronostajski und Sadowski, 1985). Ähnlich wie beim Cre/loxP-System erkennt eine Rekombinase, die Flippase (Flp), ihre Erkennungsstelle Flippase recognition target (FRT) und schneidet einen DNA-Abschnitt zwischen zwei FRT-Sequenzen aus. Die FRT-Stelle besteht ebenso wie loxP aus einer Zentralsequenz von 8 bp und zwei flankierenden Abschnitten mit 13 bp. Es existieren mehrere Sequenzmöglichkeiten für die FRT-Stelle; allerdings nur bei gleicher, homospezifischer Nukleotidabfolge arbeitet die Flippase. Für die Integration einer zirkulären DNA benötigt die Flippase eine vergrößerte FRT-Sequenz, die zusätzliche 8 bp strangaufwärts besitzt. Damit ist das Flp/FRT-System ein häufig genutztes Werkzeug zur ortsspezifischen Insertion von Transgenen (Wakabayashi-Nakao et al., 2010), das kommerziell mit FRT-tragenden Zellen angeboten wird (<http://de-de.invitrogen.com/site/de>), siehe Abb. 2.2.





**Abbildung 2.2 Vergleich zwischen Flp/FRT- und Cre/loxP-System.**

(A) Beide Systeme bestehen aus einer Zentralsequenz flankiert von 8 bp-Abfolgen. Die FRT-Stelle besitzt eine zusätzliche 8 bp-Sequenz für die Integrationskatalyse.

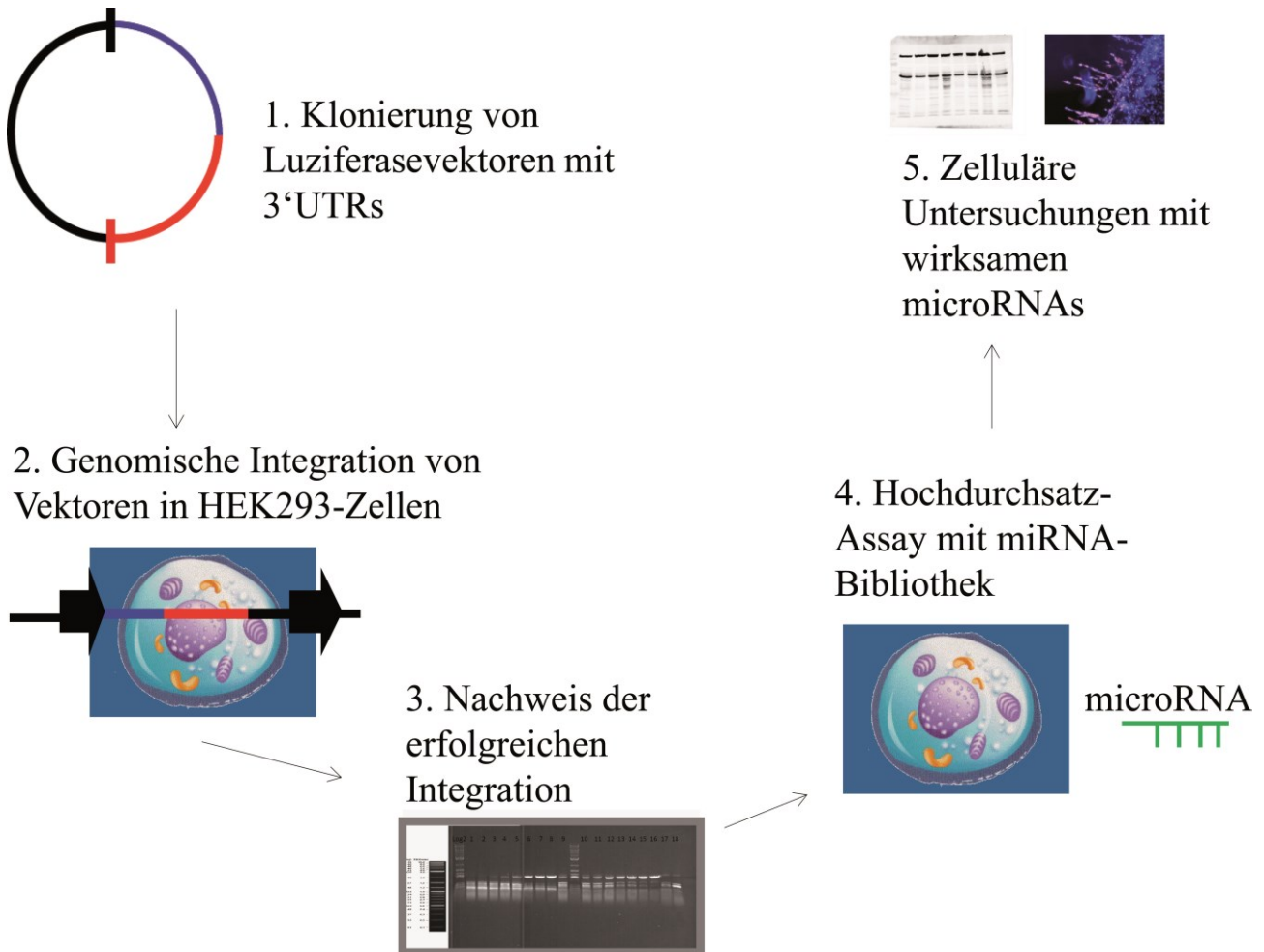
(B) Die Rekombinasen Flippase und Cre können einen DNA-Abschnitt zwischen ihren Erkennungsstellen FRT bzw. loxP ausschneiden und zirkulieren oder einen zirkulären, FRT/loxP-tragenden Vektor linearisieren und in das Genom einer humanen Zelle mit einer FRT/loxP-Stelle integrieren.

Um ein schnelles für den Hochdurchsatz geeignetes Detektionsverfahren für die Gen-microRNA-Interaktion nutzen zu können, bietet sich ein Reporterergenassay an, der automatisch auslesbar ist. Die gängigen maschinengestützten Assays detektieren Lichtquanten (Photonen), die entweder von Fluoreszenzfarbstoffen (Yeh et al., 1995) oder Luziferasen (Gould und Subramani, 1988) erzeugt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Vektorkonstrukt hergestellt werden, in dem die 3'UTR-Sequenz von Oct-4, Nanog und Sox-2 mit dem Gen für eine Luziferase als Reporter verbunden wird. In eine humane Zelllinie eingebracht, wird jeweils eine mRNA mit genspezifischer 3'UTR synthetisiert, mit der eine eingebrachte microRNA wechselwirken kann und so die Expression des Reporters beeinflusst. Eine Ab- oder Zunahme der Luziferaseaktivität kann über ein Luminometer

leicht detektiert werden (Anton et al., 2011).

Nach Auswahl wirksamer microRNAs sollten diese in einem gleichartigen Versuchsansatz validiert werden. Da es in der Literatur Hinweise auf eine Rolle von Oct-4 bei der Invasivität von Krebszellen gibt, sollte die physiologische Funktion der gefundenen wirksamen microRNAs in Invasionsassays untersucht werden.



**Abbildung 2.3** Ablaufschema der experimentellen Untersuchungen von der Klonierung der 3'UTR-tragenden Vektoren bis zum luminometrischen Hochdurchsatzverfahren.

### 3. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Wechselwirkung der 3'UTR der stammzelltypischen Gene Oct-4 (POU5F1), Nanog, Sox-2 und als Kontrollen AGTR-1 und AGTR-2 mit bekannten humanen microRNAs aus einer Bibliothek untersucht werden.

Die Repression von Stammzellgenen mit Hilfe von nativen zellulären Faktoren würde eine alternative Möglichkeit bieten, induzierte oder adulte Stammzellen für die biotechnologische Nutzung auszudifferenzieren.

Dazu sollte zunächst ein luziferasebasiertes Reportergenverfahren für Hochdurchsatz optimiert werden.

Einige durch diese Reportergenanalyse als wirksam identifizierte RNA-Moleküle sollten bezüglich ihrer Rolle in der zellulären Regulierungsmaschinerie untersucht werden. Dazu sollte die Wechselwirkung der wirksamen microRNAs in drei unterschiedlichen physiologischen Zellassays untersucht werden, um die Relevanz der gefundenen Ergebnisse außerhalb des artifiziellen Reportersystems validieren zu können.

Außerdem sollten durch ein *Mapping*-Verfahren die genauen Bindungsorte der als wirksam erkannten microRNAs identifiziert werden. Dazu sollte eine Klonierungsstrategie zur gezielten Mutation der vermuteten Bindungsorte entworfen werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Design und Klonierung von Reporter-gen-3'UTR-Plasmidvektoren

#### Material und Geräte:

##### Vektoren:

pPsiCHECK-2	Promega
pcDNA5/FRT	life-technologies/ Invitrogen
pBACs als Vorlage PCR	ImaGenes Berlin/ RZPD
Restriktionsenzyme inkl. Puffer und BSA	New England Biolabs
Fast-Ligase	New England Biolabs
DNA-Polymerase-Kit	Peqlab
genomische DNA:	Charité Universitätsklinikum
	Berlin, anonyme Spende
Oligonukleotide/ Primer	Eurofins/MWG
kompetente Bakterien E.coli Top 10	life-technologies/ Invitrogen
LB-Medium: (Hefeextrakt (5 g/l), Bakto-Trypton (10 g/l), Natriumchlorid (10 g/l))	Roth
LB-Agar (LB-Medium + Kobe-Agar 15,2 g/l)	Roth
QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Large-Construct Kit	Qiagen
PCR-Maschinen Biometra 1000 und 3000	Thermo Scientific
Photometer Nanodrop 8000	Thermo Scientific
Klonierungsprogramm VectorNTI	life-technologies/ Invitrogen
Primerkonstruktionsprogramm Primer3	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/</a>

#### Konstruktion der Vektoren *in silico*:

Mit den Sequenzen für die Plasmide pPsiCHECK-2 und pcDNA5/FRT wurde die Klonierung des Grundvektors pc5/Psi im Programm VectorNTI geplant, der die beiden Luziferase-Gene (pPsiCHECK-2) und die homologe Rekombinationsstelle und das antibiotische Restriktionsgen zur

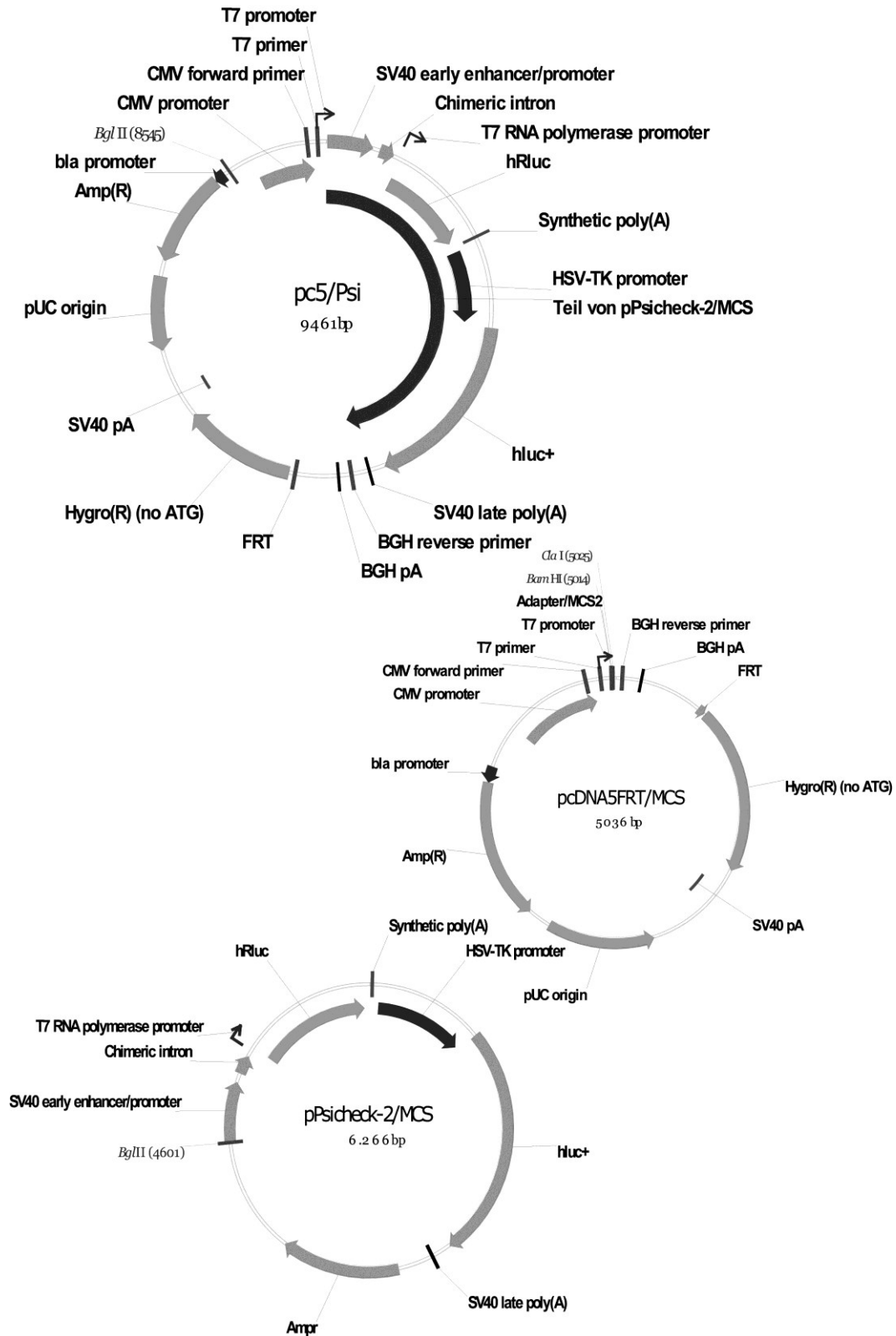
Selektion (pcDNA5/FRT) enthalten sollte (s.Abb. 4.1). Dafür war der Einbau einer neuen Klonierungsstelle (MCS) in beide Plasmide notwendig, da die benötigten Restriktionsschnittstellen nicht in beiden Molekülen vorhanden waren.

Die 3'UTR-Sequenzen der Gene für Oct-4 (POU5F1), Nanog, Sox-2, AGTR-1 und AGTR-2 wurden aus der NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Datenbank kopiert. Die Sequenzen und ID-Nummern sind im Anhang notiert.

Die benötigten PCR-Primer wurden mit dem Programm „Primer3“ konstruiert. Es wurde eine *in-silico*-PCR mit Primern durchgeführt, die nichthybridisierende Übergänge mit Sequenzen der Restriktionsenzyme zum Einklonieren in den Grundvektor besaßen. Die Bedingungen für die Konstruktion der Primer (exkl. Überhänge) wurden wie folgt gewählt:

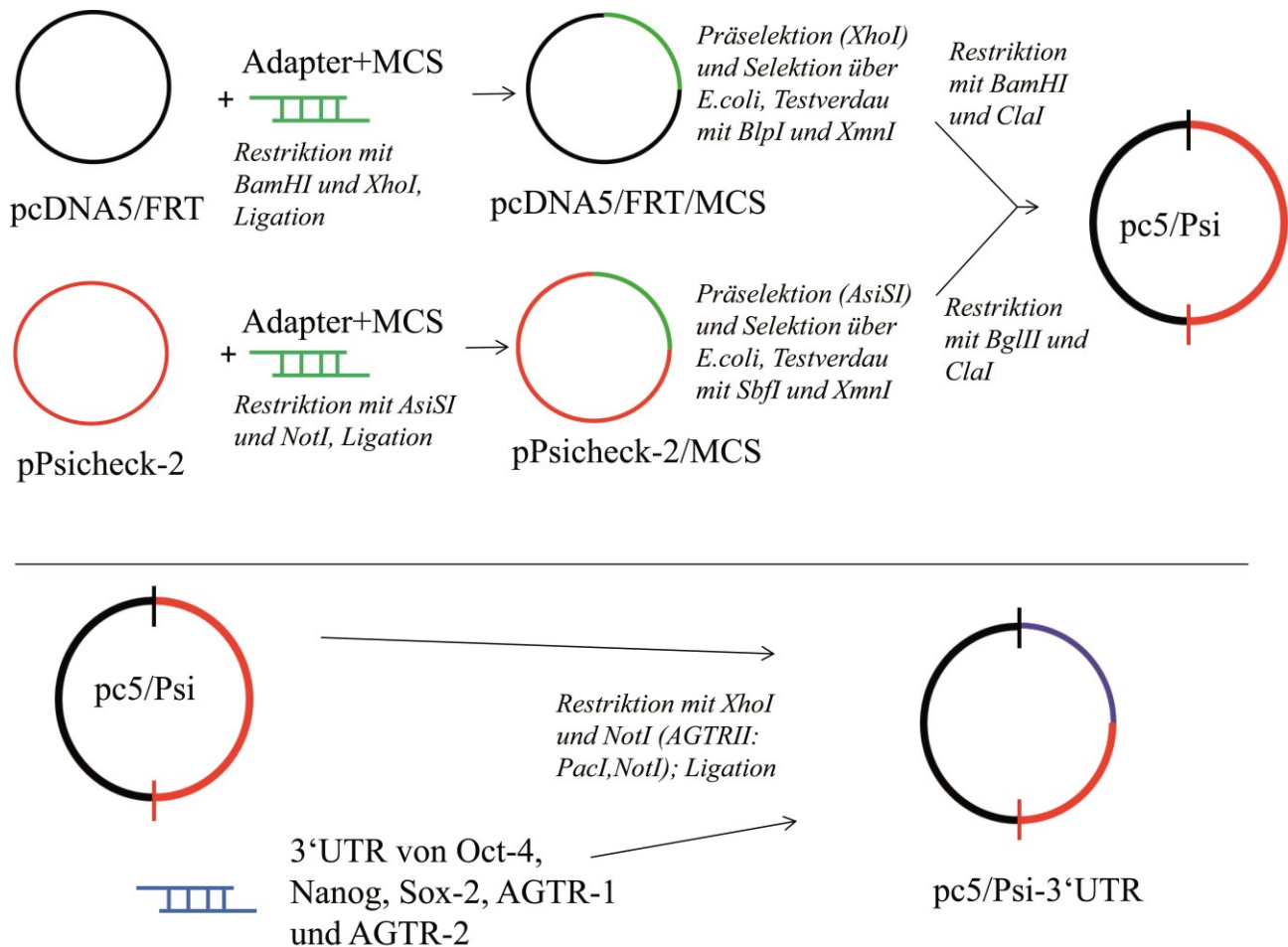
- Länge 19-28 Basen
- kein Nukleotid häufiger als 3x in Folge
- keine Palindrome
- Primer endet mit C oder G
- Primerpaare mit annähernd gleicher Anlagerungstemperatur

Das Programm „Primer3“ lieferte teilweise Sequenzen, die nicht alle Bedingungen erfüllten. Die erhaltenen PCR-Sequenzen wurden anschließend in den Grundvektor einkloniert (s. Abb. 4.2).



**Abbildung 4.1** Karten der Vektoren zur stabilen Transfektion der Testzellen: das Grundplasmid (pc5/Psi) zum Einbau der jeweiligen 3'UTR und seine beiden Ausgangsvektoren (mit zusätzlich einklonierter MCS, multiple cloning site).

Die Plasmide pPsiCheck-2/MCS und pcDNA5FRT/MCS enthalten die Luziferasene bzw. die Flippase-recognition-target-Stelle (FRT) und das Gen für Hygromycinresistenz (HygroR) zur genomischen Rekombination und sollten durch Restriktion und anschließende Ligation zum Grundvektor pc5/Psi fusioniert werden.



**Abbildung 4.2 Übersicht der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Reporter-3'UTR-Vektoren.**

#### Methodik:

Die beiden Ausgangsplasmide pPsiCHECK-2 und pcDNA5/FRT wurden von den Herstellern in gepufferter Lösung geliefert. Zur Sicherung und Vermehrung des Nukleotidmaterials wurde eine Schnelltransformation durchgeführt: 100 ng DNA in 10 µl Lösung wurden vorsichtig mit 100 µl Lösung kompetenter Bakterien (E.coli, Stamm TOP10) vermenget und bei 4°C fünf Min. inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Bakterienlösung auf eine bei 37°C vorgeheizte LB-Ampicillin-Agarplatte (c = 100 µg/ml) mit sterilen Glaskügelchen verteilt und über Nacht bei 37°C oder über drei Tage bei 21°C inkubiert (Protokoll 1, siehe unten). Nur transformierte, vektortragende und daher ampicillin-resistente Bakterien konnten auf dem LB-Agar wachsen.

Resistente transformierte Klonkolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in jeweils 5 ml LB-Ampicillin-Medium überführt. Nach erneuter Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die transgenen Bakterien teilweise kryokonserviert (Protokoll 2) mit dem Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit nach Vorschrift des Herstellers lysiert und die DNA isoliert (Protokoll 3).

Die beiden aufgereinigten Vektoren wurden nun mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI

(pcDNA5/FRT, Puffer 3, BSA) bzw. AsiSI und NotI (pPsiCHECK-2, Puffer 4, BSA) verdaut (Protokoll 4) und die Produkte gelelektrophoretisch getrennt (Protokoll 5). Die Enzyme produzierten überhängende Enden, durch die Oligonukleotide (mit Multi cloning site, MCS) mit passenden Überhängen einligiert werden können (s. Tab. 4.1).

Die Banden der linearisierten Plasmide wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelmaterial isoliert (Protokoll 6).

Die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden durch passende Adapter-Oligonukleotide in die linearisierten Plasmide eingefügt (ClaI und BpI für pcDNA5/FRT; XhoI und PacI für pPsiCHECK-2). Die Sequenzen sind in Tabelle 3.1 angegeben.

**Tabelle 4.1 Adapter-Oligonukleotide zum Einbau von Restriktionsschnittstellen in Ausgangsplasmide.** Unterstrichene Nukleotide der BpI-Erkennungsstelle sind fakultativ.

Ausgangs- vektor	Adaptersequenz (einschl. Erkennungssequenz RE und Schnittstelle')	Restrik- tions- enzym (RE)
pPsicheck-2	5'-CGTC' <u>TCGA</u> G <u>TTA AT</u> TAACCTGCAGGGC-3'	<u>PacI</u>
	3'-TAGCAG <u>AGCT</u> C <u>AAT</u> TA ATTGGACGTCCCGCCGG-5'	<u>XhoI</u>
pcDNA5/FRT	5'-GATCCACGTAT' <u>CG AT</u> GC' TTA <u>GCG</u> -3'	<u>ClaI</u>
	3'-GTGCATA <u>GC</u> TA <u>CG AAT</u> CGCAGCT-5'	<u>BpI</u>

Die Schnittstellen XhoI und AsiSI wurden durch die Einligierung der MCS gelöscht, da sie wegen gleicher Überhänge mit anderen Schnittstellen die Klonierung störten und zudem als Präselektionsenzym dienen konnten.

Die Primer wurden nach Vorschrift des Herstellers mit Reinstwasser (DNase-frei) gelöst, um eine Konzentration von  $c = 100 \text{ pmol/}\mu\text{l}$  zu erreichen. Nach 1:2-Mischung beider Primerpaare wurden die Lösungen auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und dann bei Raumtemperatur (RT) langsam abgekühlt, um eine Hybridisierung der Oligonukleotide ohne Fehlpaarungen zu erreichen. Anschließend wurden die hybridisierten Primerpaare mit den jeweiligen linearisierten Plasmiden nach Herstellerprotokoll ligiert (Protokoll 7). Um vor der nächsten Transformation bereits unerwünschte Ligationsprodukte auszuschließen, wurde ein Präselektionsverdau mit XhoI und Puffer 3, BSA durchgeführt (Protokoll 4). Dieser Verdauansatz wurde zur Transformation genutzt (Protokoll 1) und die DNA nach Kultivierung in LB-Ampicillin-Medium gewachsener Klone isoliert (Protokoll 3).



Die beiden erhaltenen Plasmide pPsiCHECK-2/MCS und pcDNA5/FRT/MCS wurden nun in getrennten Ansätzen mit den Enzymen BglII und ClaI (Puffer 3 bzw. Puffer 4, BSA, sequentiell) bzw. mit BamHI und ClaI (Puffer 3, BSA) verdaut (Protokoll 4). Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung und Reinigung der Restriktionsprodukte (Protokoll 5, 6) wurden die benötigten DNA-Sequenzen mit Hilfe einer Ligation fusioniert (Protokoll 7) und so der Grundvektor pc5/Psi hergestellt. Nach Präselektionsverdau mit dem Enzym BamHI (Puffer 3, BSA), Transformation und LB-Ampicillin-Kultur (Protokoll 8) wurde die DNA isoliert (Protokoll 7). Die Identität des pc5/Psi wurde mit einem Testverdau überprüft (Enzyme EcoRI und PacI, Puffer 1, BSA, Protokoll 4)

Die 3'UTR-Sequenzen der Gene Nanog und Sox-2 (s. Tab. 4.2) wurden mit Hilfe der PCR-Methode (s. Tab. 4.3) aus genomischer humaner DNA gewonnen. Um die PCR-Bedingungen bezüglich Primer und Anlagerungstemperaturen zu optimieren, wurde jeweils eine Gradienten-PCR mit sechs verschiedenen Temperaturen (+/- 60°C) durchgeführt.

Die PCR für die 3'UTR von Oct-4 (s. Tab. 4.2) konnte aus der genomischen DNA nicht erfolgreich amplifiziert werden. Daher wurden Plasmide aus einer humanen Genombibliothek (pBAC, s. Anhang) als Vorlage-DNA genutzt. Die Plasmide wurden aus einer Bakterien-Agarkultur (*E. coli*) gepickt, angeimpft (Protokoll 8) und isoliert (Protokoll 9). Anschließend wurde die pBACs in einer PCR nach oben angegebenem Schema eingesetzt.

**Tabelle 4.2 Primersequenzen für die PCR zur Gewinnung der 3'UTR von Oct-4, Nanog und Sox-2.**  
Überhänge mit Restriktionsstellen kursiv. Die Schnittstellen wurden mit Füllsequenzen versehen, um den Restriktionsenzymen eine genügend lange Sequenz zum Angreifen zu bieten.

Gen-3'UTR	Primer	Sequenz (5'-3')	(°C) Hybridisierungstemperatur
<b>Oct-4</b>	Primer vorwärts	<i>ACGTACTCGAGAGCAT</i> GTACTCCTCGGTCCCTTTCC	59,8
	Primer rückwärts	CTAGTGCGGCCGCGTACCTCAGGGTCACTTGGGTATGAG	59,8
<b>Nanog</b>	Primer vorwärts	<i>ACGTACTCGAGAGCAT</i> GCAACCTGAAGACGTGTGAA	59,8
	Primer rückwärts	CTAGTGCGGCCGCGTACCATTTCCTTCTCCACCCCAAC	59,8
<b>Sox-2</b>	Primer vorwärts	<i>ACGTACTCGAGAGCAT</i> ATACTGCCCCTCTCACACAT	60,2
	Primer rückwärts	CTAGTGCGGCCGCGTACCTGCTTTCTTGGCTGAGCAC	60,2
<b>Anhang</b>	Primer vorwärts	<i>ACGTA – CTCGAG – AGCAT</i> Füllseq. - XhoI – Füllseq.	
	Primer rückwärts	<i>CTAGT – GCGGCCGC – GTACC</i> Füllseq. - NotI – Füllseq.	

**Tabelle 4.3 Parameter der PCR zur Gewinnung der Stammzellgen-3'UTR-Sequenzen.**  
PCR-Ansatz und PCR-Programm.

PCR-Puffer	Volumen (µl)
dNTPs 5 mM	2,5
Primer vorwärts	1
Primer rückwärts	1
DNA-Vorlage 100 ng	1
Wasser	16,75
DNA-Polymerase	0,25
gesamt	25

**Programm:**

<b>Schritt</b>	<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit in Sekunden</b>
<b>1</b>	Enzymaktivierung	95°C	300
<b>2</b>	DNA-Aufschmelzung	95°C	30
<b>3</b>	Primeranlagerung	54, 56, 58, 60, 62, 64°C	30
<b>4</b>	Verlängerung	72°C	45
<b>5</b>	Endverlängerung	72°C	300
<b>6</b>	Aufbewahrung	4°C	ohne Begrenzung

Schritt 2-4 wurden 39 mal wiederholt.

Die PCR-Ansätze wurden nach dem Ende des Laufs in einer Gelelektrophorese aufgetragen, um die Produkte zu isolieren (Protokoll 5). Die Produktsequenzen der Gene wurden manuell ausgeschnitten und aufgereinigt (Protokoll 6).

Die 3'UTR-Sequenz von AGTR-1 und AGTR-2 wurde nicht über PCR, sondern durch Restriktionsverdau mit XhoI und NotI aus einem laborintern vorhandenen Plasmidvektor (pPsiCHECK-2-AGTR1, -AGTR-2) gelöst, gelelektrophoretisch aufgetrennt und gel isoliert (Protokolle 4-6).

Der Grundvektor pc5/Psi und die PCR-Produkte wurden nun einzeln mit den Enzymen XhoI und NotI, Puffer 4 und BSA verdaut (Protokoll 4). Anschließend wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die benötigten Sequenzen von ausgeschnittenem Material zu separieren, und aufgereinigt (Protokoll 5, 6). Daraufhin folgte die Ligation der einzelnen 3'UTRs mit dem pc5/Psi (Protokoll 7).

Die Ligationsprodukte wurden in einer Transformation eingesetzt (Protokoll 1), gewachsene Klone gepickt, kultiviert (Protokoll 8) und die Plasmid-DNA isoliert (Protokoll 3). Die Identität der fünf verschiedenen 3'UTR-pc5/Psi-Vektoren wurde mittels Sequenzierung (Eurofins/MWG) überprüft.

Dabei sollten die erhaltenen Sequenzen die Übergänge zwischen dem Vektorrückgrat und den inserierten 3'UTRs abdecken. Die gewählten Primer erlauben die Ansequenzierung von beiden Seiten der 3'UTRs (s. Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4 Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der Identität der 3'UTR-tragenden Vektoren.**

Sequenzierungsprimer	Sequenz (5'-3')
pc5/Psifow	GAGATCCCTCTCGTTAAGGG
pc5/Psirev	CGGAGGGCGGGGGGGTGCTT

### **Molekularbiologische Protokolle**

1. Schnelltransformation: 100 ng DNA in 10 µl Lösung wurden vorsichtig mit 100 µl Lösung kompetenter Bakterien (*E.coli*, Stamm TOP10) vermennt und bei 4°C fünf Min. inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Bakterienlösung auf eine bei 37°C vorgeheizte LB-Ampicillin-Platte mit sterilen Glaskügelchen verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nur transformierte, vektortragende und daher ampicillinresistente Bakterien konnten auf dem LB-Agar wachsen.
2. Kryokonservierung von *E.coli*-Bakterien: Von 5 ml bakterienhaltiger LB-Amp-Lösung wurden 0,5ml mit 0,5ml Glycerinlösung (Glycerin: Wasser =1:1) vermennt und 10 min. bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Konservierung bei -80°C. Um Bakterien erneut anzupflanzen, wurde die Kryokultur nur wenige Sekunden RT ausgesetzt und eine kleine Probe mit einer Pipettenspitze in LB-Medium überführt.
3. DNA-Isolation aus *E.coli*-Bakterien mit dem Qiagen-MiniPrep-Kit: Von 5 ml bakterienhaltiger LB-Amp-Lösung werden 4,5 ml bei 10.000\* g und 4°C herunter-zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet mit 250 µl Puffer 1 (inkl. RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer 2 wurden die Zellen lysiert; und durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 die bakteriellen Proteine gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.500\* g, 10 Min.) waren die pelletierten Eiweiße und Zellbestandteile von der DNA im Überstand getrennt. Der Überstand wurde nun in eine QIAquick Spin-Säule überführt und mittels erneuter Zentrifugation (13.500\* g, 1 Min.) an

die Membran gebunden. Nach Waschung der Membran mit 750 µl ethanolhaltigem PE-Puffer und anschließender Trocknung durch Zentrifugation (13.500\* g, 1 Min.) wurde die aufgereinigte DNA mit 50 µl EB-Puffer eluiert (13.500\* g, 1 Min.). Die Messung der erhaltenen DNA-Konzentration und der Reinheit erfolgte mit dem Nanodrop-Photometer. Dabei wurden Konzentrationswerte ab 200 ng/ µl Lösung und Reinheitswerte (280/260 nm) von 1,8-2,2 als ausreichend erachtet.

4. Restriktionsverdau von DNA: In einem 30 µl-Ansatz wurden 2 µg DNA mit je 1 µl von einem oder zwei Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) mit 3 µl des passenden Puffers, ggfls. mit 3 µl BSA-Lösung (10x) und der benötigten Menge Reinstwassers (DNase-frei) gründlich vermischt und bei 37°C 120 Min. inkubiert.
5. Gelelektrophorese von DNA: 1% Agarose in Tris-Borat-Puffer mit 1µl/ml SybrSafe (lfe-technologies/ Invitrogen). Es wurde eine Spannung je nach Gelgröße von 80-200 V angelegt.
6. Gelisolat von DNA mit dem Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit: Das aus dem Gel geschnittene DNA-Material wurde gewogen; das Volumen wird dem Gewicht gleichgesetzt ( $x \mu\text{l} = x \mu\text{g}$ ). Das dreifache Volumen des Puffers QG wurde hinzugegeben und bei 50°C inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hat. Danach wurde das gleiche Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und die Lösung durch Zentrifugation (13.500\* g, 1 Min.) auf die Membran einer QIAquick Spin-Säule gebracht. Nach Waschung der Membran mit 750 µl ethanolhaltigem PE-Puffer und anschließender Trocknung durch Zentrifugation (13.500\* g, 1 Min.) wurde die aufgereinigte DNA mit 20 µl EB-Puffer eluiert (13.500\* g, 1 Min.). Eine photometrische Messung war nicht sinnvoll, da nach einer Gelelution DNA-Menge und -Reinheit stets gering sind.
7. Ligation von DNA: 100 ng Empfänger-DNA (in 2µl Lösung) und 100 ng Donor-DNA (in 2µl Lösung) wurden mit 5 µl Fast-Ligase-Puffer und 1 µl Fast-Ligase gründlich gemischt. Die Lösung wurde bei RT 1 h inkubiert.
8. LB-Medium-Kultivierung von *E.coli*: Von LB-Agar-Platten mit Antibiotikum (Ampicillin) oder aus einer Kryokultur gepickte Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium mit Amp ( $c = 100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) über Nacht bei 37°C im temperierten Schüttlerschrank inkubiert.

9. DNA-Isolation von pBACs aus *E. Coli* (QIAGEN Large-Construct Kit): Die Bakterien mit den pBACs (Chloramphenicol-Resistenz) wurden über Nacht in 40ml antibiotikumhaltigem (25 µg/ml) LB-Medium bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml Kulturmedium in Zentrifugengefäße (50 ml) überführt und die Bakterien abzentrifugiert. 250 µl des Puffers P1 wurden zur Resuspension genutzt und fünf min. inkubiert. Danach wurden 250 µl Puffer P2 hinzugegeben (Zellwandlyse), geschüttelt und erneut 5min. inkubiert (RT). Die Proteinfällung erfolgte mit 250 µl Puffer N3 schüttelnd. Anschließend wurde 10 min. auf Eis gekühlt und bei 4°C die Proteine abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein Zentrifugengefäß (50 ml) gegeben und mit kaltem Isopropanol aufgefüllt, invertiert und auf Eis gekühlt, um die DNA zu präzipitieren. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei max. 13.500\* g (4°C) wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit 70%(Vol.) Ethanol gewaschen und erneut bei max. Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5 min. getrocknet. Die Lösung erfolgte in 50 µl EB-Puffer (Qiagen) über eine Stunde bei 37°C.

## 4.2 Stabile Transfektion von HEK293-FRT-Zellen mittels homologer Rekombination

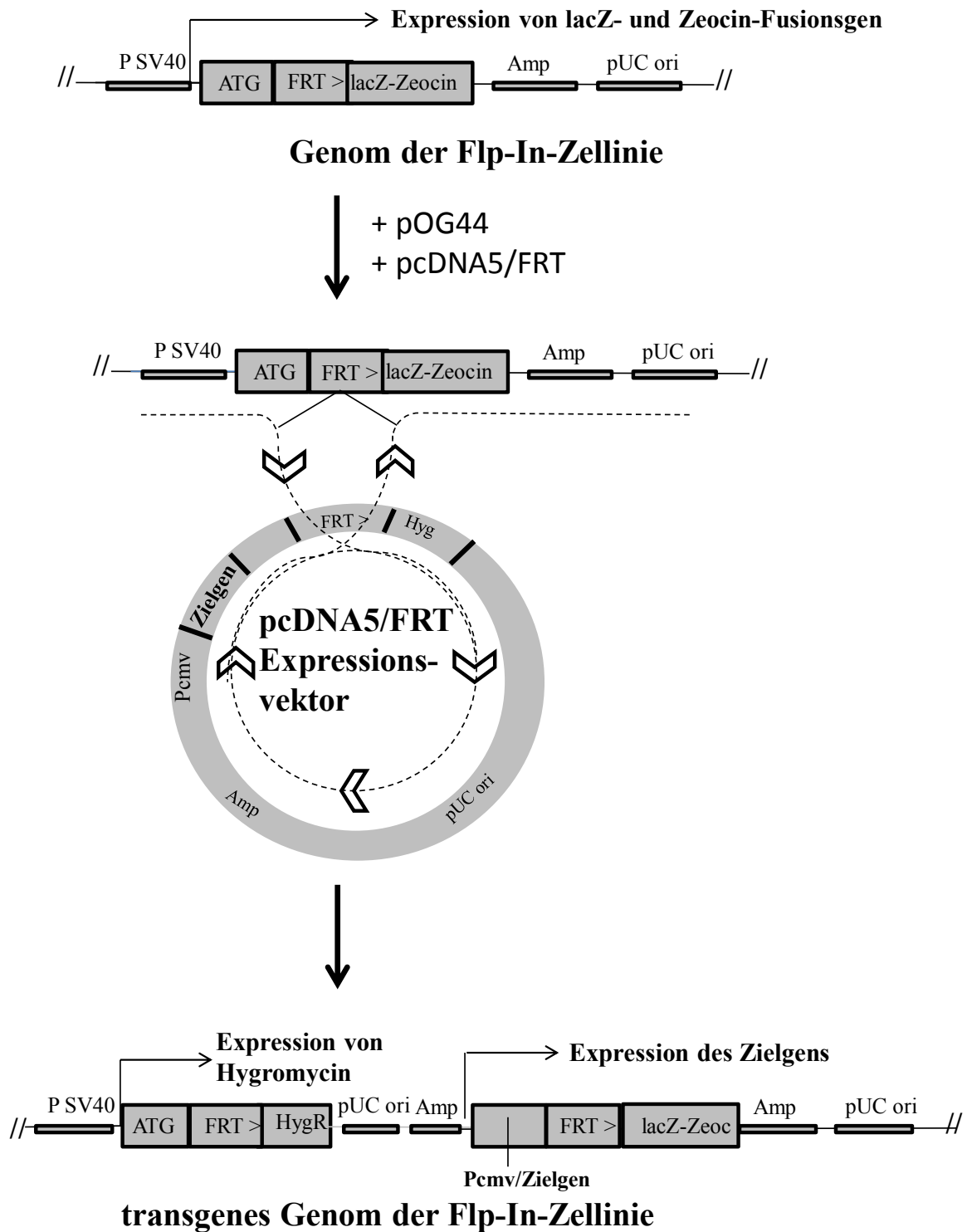
### Material und Geräte:

HEK293-Flp-In-Zellen	life-technologies/ Invitrogen
Oligonukleotide/ Primer	Eurofins/MWG
Vektor pOG44	life-technologies/ Invitrogen
Roti-Fect	Roth
Opti-MEM	life-technologies/ Invitrogen
Hygromycin B	life-technologies/ Invitrogen
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol PCI	Roth
Vollmedium (DMEM, FKS 10%, Penicillin-Streptomycin 1%)	Biochrom
Teilmedium (DMEM, FKS 10%)	Biochrom
Verdaupuffer	
10mM Tris-Cl pH8	Roth

25mM EDTA-Dinatrium pH 8	Roth
100mM NaCl	Roth
0,5% SDS	Roth
0,1mg/ml Proteinase K (frisch)	Promega
Ammoniumacetat 7,5M	Roth
DNA-Polymerase Phusion Hot Start II Kit	Thermo Scientific Finnzymes
Nanodrop-8000	Thermo Scientific
Gradienten-PCR-Gerät	Sensoquest Labcycler

### Das Flp-In-System

Flp-In ist ein homologes Rekombinationssystem aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das Enzym Flp-Rekombinase erkennt eine Signalsequenz (FRT) in Donor- und Empfänger-DNA-Sequenz, schneidet seitlich beider FRTs und ligiert so, daß die Donorsequenz flankiert von den beiden FRTs in der Empfänger-DNA zu liegen kommt (s.Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3 Das Flp-In-System nach Protokoll von life-technologies/ Invitrogen.**

(verändert nach <http://www.lifetechnologies.com>)

Die verwendeten HEK293-Zellen enthalten ein genomisches Transgen mit einer FRT-Stelle, einem Resistenzgen (Zeocin) und einem Startsignal (ATG) unter Kontrolle eines SV40-Promotors. Der Vektor pcDNA5/FRT (in dieser Dissertation der Abkömmling pc5/Psi, s.o.) enthält das Zielgen und das Gen für die Resistenz gegenüber dem Selektionsantibiotikum Hygromycin (Hyg). Das Hygromycin-Resistenzgen besitzt kein ATG-Startsignal und kann so in untransfizierten Zellen nicht abgelesen werden.



Werden der Vektor pcDNA5/FRT und das Hilfsplasmid pOG44 in die Zellen transfiziert, katalysiert die produzierte Rekombinase Flippase durch Restriktion und Ligation den Einbau des FRT-tragenden Plasmids in das Genom. Dadurch kommt das Hygromycin-Resistenzgen des FRT-Vektors hinter der ATG-Sequenz zu liegen, wodurch das Gen abgelesen werden kann und den Zellen nun Resistenz gegenüber dem Antibiotikum verleiht.

Die verwendete Zelllinie HEK293-Flp-In besitzt genau eine FRT-Stelle im Genom, so daß die Flp-Rekombinase einen pc5/Psi-3'UTR-Vektor nur einmal einbaut. Dadurch wird gewährleistet, daß transfizierte Zellen jeweils nur eine Kopie der Gene für die Firefly- und die Renilla-Luziferase enthalten und so verlässliche Signale im Dual-Luziferase-Assay liefert.

HEK293-Flp-In-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 90% in einer Schale mit 10 cm Durchmesser kultiviert. In diesem Stadium besitzen die Zellen durch hohe Dichte von Wachstumsfaktoren eine hohe Wachstumsrate, was die Aufnahme von Transfektions-Liposomen in die Zellmembran erleichtert.

Die Zellen wurden mit erwärmtem PBS (37°C) gewaschen, um Reste von Antibiotikum zu entfernen und mit 10ml Teilmedium (s. Materialliste) weiterkultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Zu dem Teilmedium wurde eine Transfektionslösung gegeben, die den pc5/Psi-Vektor mit der 3'UTR des jeweiligen Gens und den Hilfsvektor pOG44 enthielt. Der pOG44 kodiert für die Flippase, welche die Integration des pc5/Psi katalysiert.

Für die Herstellung der Transfektionslösung wurden 100 µl Opti-MEM wurden 2 µg des jeweiligen pc5/Psi-Vektors und 18 µg des pOG44 vermischt. Weiterhin wurden 100 µl Opti-MEM mit 10 µl Roti-Fect liposomales Transfektionsagens versetzt und dann beide Ansätze gründlich gemischt und mindestens 15 Min. bei RT inkubiert, um die Komplexierung, also die Aufnahme der Nukleinsäuren in die Liposomen, zu gewährleisten.

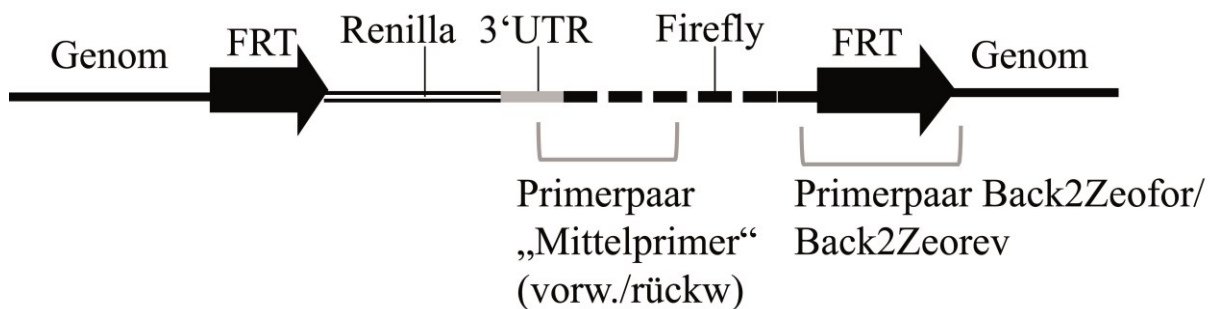
Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Vollmedium ersetzt und die Zellen einen weiteren Tag kultiviert. Danach erfolgte ein Zellsplitting 1:5. Nach Anwachsen der Zellen wurden nun 10 ml Vollmedium mit 300 µg/ml Hygromycin B zu den Zellen gegeben und 24 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch 10 ml Vollmedium mit 100 µg/ml Hygromycin ersetzt und mindestens eine Woche weiterkultiviert.

Durch das Selektionsantibiotikum Hygromycin starben die untransfizierten und somit nicht-resistenten Zellen ab; wohingegen transfizierte Flp-In-Zellen überlebten und nach frühestens einer Woche makroskopisch sichtbare Klonkolonien bildeten, die durch Splitting vermehrt wurden, um genügend transgene Zellen für das Screening zu erhalten.

Die transgenen Zellen wurden durch PCR von genomischer DNA auf das Vorhandensein des vollständig transfizierten pc5/Psi-Vektors mit der jeweiligen 3'UTR untersucht (s. Tab. 4.6).

Dafür wurden nahezu konfluente Zellen aus einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit einem Schaber gekratzt und mit PBS gewaschen; danach ohne PBS eingefroren (-20°C). Nach dem Auftauen wurden die Zellen über Nacht bei 50°C mit 2 ml Verdaupuffer inkubiert, bis kein Zellmaterial in der Lösung mehr sichtbar war. Danach wurden 2 ml PCI hinzugegeben und sorgfältig invertiert. Nach Überführen des Gemisches in 2ml-Reagiergefäße wurde 30 min. bei 4°C und 10.000\* g zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zellproteine und Membranbestandteile von den Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase, von der die Hälfte mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt wurde. Zu der DNA-haltigen Lösung wurden 2 Vol. eiskaltes Reinstethanol und ein halbes Vol. Ammoniumacetat gegeben und sorgfältig gemischt. Die DNA fiel nun aus und wurde 10 min. bei 10.000\* g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit Ethanol 70% gewaschen, zentrifugiert und getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl EB-Puffer (Qiagen) gelöst und die Konzentration und die Reinheit mit dem Nanodrop bestimmt.

Die genomische DNA der verschiedenen Zelllinien wurde für eine Gradienten-PCR genutzt. Dabei sollten sowohl Primerpaare zum Einsatz kommen, die die Übergangsstelle zwischen Transgen und genomischer DNA amplifizieren, als auch Produkte liefern, die spezifisch Sequenzen im jeweiligen Transgen (Oct-4, Nanog, Sox-2, AGTR-1, AGTR-2) repräsentieren (s. Abbildung 4.4 und Tab. 4.5).



**Abbildung 4.4 Symbolische Darstellung des integrierten Vektors pc5/Psi mit jeweiliger 3'UTR im Genom der FLP-In-HEK293-Zellen.**

Für die Gradienten-PCR zur Überprüfung des korrekten Einbaus wurde ein Primerpaar gewählt, das die Übergangsstelle zwischen Genom und Transgen an der FRT-Stelle abdeckt: Back2Zeo for und -rev. Die Namen sind Abkürzungen für „Backbone“ (genomische Sequenz), „Zeo“ für „Zeocinresistenz“ (Sequenz im Transgen), „for“ und „rev“ für „forward“ und „reverse“.

Weiterhin wurde ein Primerpaar gewählt, dessen PCR-Produkt eine 3'UTR-spezifische Sequenz aus dem Transgen liefert. Der Vorwärtsprimer war hier spezifisch für die jeweilige 3'UTR („Mittelprimer vorwärts“); der Rückwärtsprimer hybridisiert UTR-unspezifisch im Bereich des Firefly-Luziferase-Gens („RückFfly“, „2RückFfly“, „HSVRückFfly“) und konnte daher bei allen PCRs verwendet werden.

Tabelle 4.5 Primersequenzen für die PCR zum Nachweis der Transgene in HEK293-Flp-In-Zellen.

Primer	Sequenz (5'-3')
<b>Back2Zeofor</b>	CTCGCCACGTTTCGCCGGCTT
<b>Back2Zeorev</b>	CTGCAAGGCGATTAAGTTGG
<b>Mittelprimer vorwärts</b>	
<b>Oct4</b>	AGAAGCCTGGGACACAGTAGATAGACACAC
<b>Nanog</b>	GAGGTCTCGTATTTGCTGCATCGTAATG
<b>Sox2</b>	CGGCTCTGTATTATTGAATCAGTCTGCC
<b>AGTR1</b>	GCACTGGTCCCAAGTAGTAGTGTCTTCCTAG
<b>AGTR2</b>	AAAGGAACCTGTCAGGGCAGTACAATG
<b>Mittelprimer rückwärts</b>	
<b>RückFfly</b>	TCCTCCAGAGGGTAGAAGGGAGCAG
<b>2RückFfly</b>	TTCATGGCCTTGTGCAGCTGC
<b>HSVRückFfly</b>	TCTCCGGTAATATCACCGCAGTCG

Tabelle 4.6 Parameter der PCR zum Nachweis der Transgene in HEK293-Zellen.

PCR-Ansatz und –Programm.

Ansatz		Programm			
	Vol. (µl)	Schritt		Temp. °C	Dauer (Sek.)
<b>DNA 100 ng</b>	1	<b>1</b>	initiale Denaturierung DNA	98	300
<b>Puffer HF</b>	4	<b>2</b>	Denaturierung DNA	98	30
<b>dNTPs 10 mM</b>	0,4	<b>3</b>	Anlagerung	x	30
<b>Wasser</b>	12,4	<b>4</b>	Verlängerung	72	45
<b>DNA-Polymerase</b>	0,2	<b>5</b>	Endverläng.	72	300
<b>Primer vorwärts</b>	1	<b>6</b>	Lagerung	4	unbegrenzt
<b>Primer rückwärts</b>	1	x= Gradient: 54, 56, 58, 60, 62, 64°C. Schritte 2-5 35 mal.			
<b>gesamt</b>	<b>20</b>				

### 4.3 Überprüfung der Transfektion mit microRNA

#### Material und Geräte:

HEK293-Flp-In-Zellen mit pc5/Psi-3'UTR-Konstrukt	s.o.
Lipofectamine-RNAiMAX	life-technologies/ Invitrogen
premiRNA-Alexa555	life-technologies/ Ambion
Opti-MEM Transfektionsmedium	life-technologies/ Invitrogen
DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Biochrom
µClear 96well-Platte für Luminometrie	Greiner Bio-One
Fluoreszenz-Inversmikroskop Axiovision Z1	Zeiss
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710	Zeiss

Zur Überprüfung der Aufnahmefähigkeit von miRNAs wurden HEK293-Zellen mit dem integrierten pc5/Psi-3'UTR (hier AGTR-1) revers mit einer Fluorophor-markierten Kontroll-RNA (Alexa555) transfiziert. Nach Vorgaben des Herstellers wurden 0,2 µl Lipofectamine-RNAiMAX mit 19 µl Opti-MEM Transfektionsmedium und 0,8 µl premiR-Alexa555-Lösung (10 pmol absolut) pro Vertiefung in einer Luminometerplatte gemischt und 15 Min. bei RT inkubiert, um die Aufnahme der Nukleinsäuren in die Liposomen des Lipofectamines zu gewährleisten. Anschließend wurden 50.000 Zellen in 100 µl antibiotikafreiem DMEM/FKS hinzupipettiert und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24 h wurden die Zellen lebend bei einer Wellenlänge von 555nm im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 4.4 Optimierung des Dual-Luziferase-Assays

#### Material und Geräte:

HEK293-Flp-In-Zellen mit pc5/Psi-3'UTR-Konstrukten	s.o.
Lipofectamine-RNAiMAX	life-technologies/ Invitrogen

Humane premiRNA-155(-5p)	life-technologies/ Ambion
Opti-MEM Transfektionsmedium	life-technologies/ Invitrogen
DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Biochrom
µClear 96well-Platte für Luminometrie	Greiner Bio-One
passiver Lysepuffer, 1:5 verdünnt (Wasser)	Promega
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Na <sub>2</sub> )	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	Roth
Coenzym A (CoA)	Roth
tetra-Natriumpyrophosphat (TSPP)	Roth
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Coelenterazin	Promega
D-Luziferin	PJK
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth
Luminometer Luminoskan	LabSystems
Luminometer Glomax	Promega

**Hinweise:** Da microRNAs in der Zelle aus einem doppelsträngigen Vorläufermolekül hergestellt werden, wurde zur Unterscheidung die Endung -5p oder -3p (engl. „5prime“ und „3prime“) in die Nomenklatur aufgenommen. -5p verweist auf die Sequenz, die vom 5'-Ende her, -3p auf das Molekül, das vom 3'-Ende her sequenziert wurde. Eine Angabe wie premiRNA-155 ohne diese spezifische Endung verweist auf die -5p-Sequenz.

Weiterhin erfolgt die Namensgebung der microRNAs erfolgt in der Reihenfolge ihrer erstmaligen Sequenzierung.

Unterschiedliche Vorläufer-Sequenzen und genomische Loci, die identische reife Sequenzen exprimieren, erhalten Namen der Form miR-155-1 und hsa-mir-155-2. Mit Buchstaben bezeichnete Suffixe benennen eng verwandte reife Sequenzen - zum Beispiel hsa-miR-155a und miR-hsa-155b.

miRNA-Klonierungsstudien identifizieren teils zwei Sequenzen mit ca. 22 Basen, die von demselben vorhergesagten Vorläufer stammen. Wenn die relativen Mengen klar angeben, welche die überwiegende miRNA-Form ist, werden die reifen Sequenzen durch Namen der Form miR-155

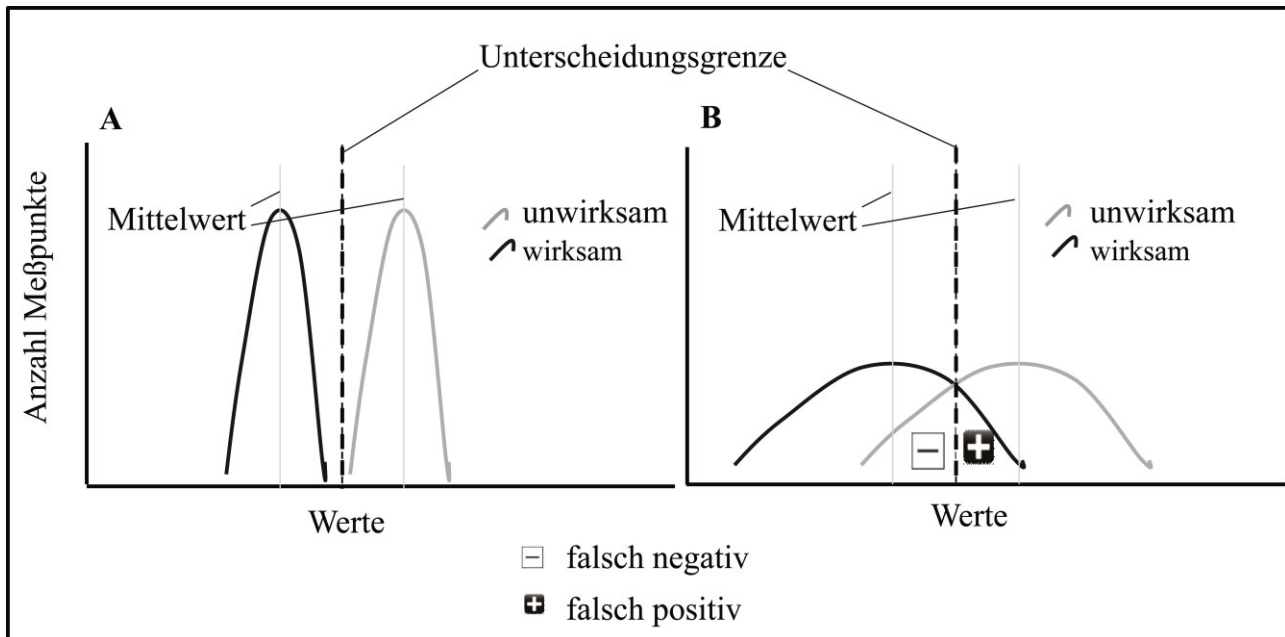
*(Hauptprodukt) und miR-155\* (aus dem entgegengesetzten Arm der Vorstufe) zugeordnet. Wenn die Daten nicht ausreichend sind, um zu bestimmen, welche Sequenz die vorherrschende ist, werden Namen wie miR-142-5p (vom 5'-Arm) und miR-142-3p (vom 3'-Arm) vergeben (s. Datenbank miRBase, <http://www.mirbase.org/>).*

*Die verwendeten premiRNAs des Herstellers life-technologies/Ambion sind stabilisierte doppelsträngige Moleküle und daher nicht identisch mit den natürlichen premiRNAs, die eine Stammschleifenstruktur besitzen (s. Abb. 2.1).*

Die microRNA-Interaktion mit den 3'UTRs der stammzelltypischen Gene wurde als Triplikat im Hochdurchsatzverfahren analysiert. Dafür war es notwendig, das Verfahren im Vorfeld zu optimieren. Dafür existierten folgende Anforderungen: Es sollte sichergestellt sein, dass die Werte für Messsignale erheblich über dem Grundrauschen, also der unspezifischen Grundaktivität der Enzyme bzw. des Substrates liegt. Die Messzeit sollte minimiert werden bei gleichzeitig günstigem Messintervall. Darüberhinaus sollten die Messergebnisse weitere Qualitätsmerkmale besitzen, so die Monotonie einer Verdünnungskurve und die Reduktion von Einflüssen wie Temperatur- und Luftsauerstoffempfindlichkeit.

#### **4.4.1 Luminometrisches Protokoll und günstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis**

Die Standardabweichungen eines Probenreplikates mussten möglichst gering sein, um die Unterscheidbarkeit des Signals einer wirksamen von einer unwirksamen microRNA zu gewährleisten. Daher wurden zunächst Probeversuche mit einer bekannt wirksamen microRNA durchgeführt, um die erhaltenen Werte mit einem statistischen Test für Hochdurchsatzverfahren zu überprüfen (Z-Faktor).



**Abbildung 4.5 Luminometrisches Reportergenverfahren: günstiges (A) gegenüber ungünstigem (B) Signal-Hintergrund-Verhältnis.**

Da Säuger-microRNAs die Expression bestimmter Gene feinregulieren (Sevignani et al., 2006) und damit die Signalstärke gegenüber den Kontrollen nur im Bereich von etwa 20-80% zu erwarten ist, dürfen die technisch bedingten Standardabweichungen der Probenmittelwerte nur sehr gering sein, um eine Signalstärkenunterscheidung vornehmen zu können. Die Breite der Standardabweichungen ist im Bild durch die Glockenkurven dargestellt. Sind die Kurven schmal (A), ist eine Unterscheidung der Signalwerte möglich. Sind die Kurven zu breit (B), überlappen sie und lassen keine statistisch abgesicherte Unterscheidung von falsch positiven bzw. negativen Messergebnissen zu.

Die microRNA-155 wurde als herabregulierend für die Expression des Angiotensin-Rezeptors-1 (AGTR-1), aber nicht des AGTR-2 beschrieben (Martin et al., 2006). Daher wurde die premiRNA-155 desselben Anbieters, von dem auch die zu screenende premicroRNA-Bibliothek bezogen wurde, in HEK293-Flp-In-Zellen mit der 3'UTR des AGTR-1 und zur Kontrolle des AGTR-2 transfiziert. Um gleichzeitig zu überprüfen, welche absolute Menge an premicroRNA benötigt wird, um ein detektierbares Signal für die Herabregulation zu erhalten, wurden verschiedene Konzentrationen im Transfektionsmedium eingesetzt.

Die reverse Transfektion der Zellen wurde im Mikrotiterplatten-Format (96w) wie folgt angesetzt: Pro Vertiefung wurden 0,2 µl Lipofectamine RNAiMAX; 1,88; 3,75 und 7,5 oder 7,5; 15 und 30 pmol premicroRNA und 19,8-x µl Opti-MEM angesetzt und 15 min. bei RT inkubiert (x = jeweiliges Volumen der premicroRNA-Lösung). Es wurde Transfektionsmedium für Hexaplikate angesetzt, wovon jeweils 20 µl pro Napf in eine Luminometerplatte pipettiert wurden. Auf das Transfektionsmedium wurden 100 µl Zellsuspension gegeben und 24 h bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um das benötigte Minimum an Zellen zu ermitteln, wurden 50.000, 25.000 oder 12.500 Zellen in je 100 µl Medium verwendet.

Nach Ende der Inkubation wurde das Medium abpipettiert und 20 µl 1:5 mit Reinstwasser verdünnter passiver Lysepuffer pro Napf auf die adhärenierten Zellen gegeben. Die Luminometerplatten mit den Zellen wurden 15 min. bei RT geschüttelt, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Anschließend wurden die Zellen bei -20°C eingefroren.

Für die Messung der enzymatischen Lumineszenz-Signale standen zwei Protokolle für die Herstellung von Substratpuffern für Firefly- und Renilla-Luziferase zur Wahl. Beide Protokolle sahen den seriellen Einsatz der Enzymsubstrate während der Messung vor. Da sowohl das Firefly- wie auch das Renilla-Enzym ihr Optimum bei pH = 7,8 besitzen, die Renilla-Luziferase aber im Gegensatz zur Firefly-Luziferase auch noch bei pH ≤ 7 kräftige Signale liefert, wurde das D-Luziferin in einem Puffer mit pH = 7,8 zuerst, dann das Coelenterazin in einer Pufferlösung mit pH=5 eingesetzt. Die Mischung gleicher Mengen von beiden Puffern resultiert in einem pH-Wert unter 7.

Das laborintern bereits etablierte Protokoll für die Messung der Aktivität von Firefly- (Gaunitz et al., 1996) und Renilla- Luziferase (Dyer et al., 2000) (s. Tab 4.7 und 4.8) sah eine geringe Endkonzentration des Renilla-Substrates Coelenterazin in der Lösung vor (1,43 µM). Da im vorliegenden Experiment die Renilla-Luziferase als responsiver Reporter eingesetzt wurde, war es sinnvoll, ein möglichst starkes Renilla-Signal zu erhalten, um prozentuale Änderungen leichter detektierbar zu machen. Daher wurde ein alternatives Protokoll zur Herstellung der Substratlösungen mit einer deutlich höheren Coelenterazinkonzentration (4 µM) verwendet (Hampf und Gossen, 2006).

**Tabelle 4.7 Herstellungsprotokoll D-Luziferin-Substratpufferlösung für Firefly.**

Stoff	Konzentration in Lösung (mM)	M (g/mol)	für 1,2 l	Einheit
Tris- HCl	200	157,6	37,92	g
MgSO <sub>4</sub>	15	120,37	2,17	g
EDTA- Na <sub>2</sub>	0,1	372,24	44,67	mg
DTT	25	154,25	4,63	g
ATP	1	507,181	609	mg
CoA	0,2	767,5	184,2	mg
D- Luziferin	0,2	280,32	67,28	mg

Fertige Lösung auf pH=8 mit NaOH titriert.



Die komplette Substratlösung wurde in 50 ml- und 15 ml-Röhrchen abgefüllt und bei -80°C konserviert.

**Tabelle 4.8 Herstellungsprotokoll Coelenterazin-Substratpufferlösung für Renilla.**

Stoff	Konzentration in Lösung (mM)	M (g/mol)	für 2 l in g
TSPP	25	446,06	22,4
NaAc	10	82,03	16,41
EDTA- Na <sub>2</sub>	15	372,24	11,17
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	142,04	142
NaCl	500	58,44	58,44
Coel.	0,004	423,5	

Fertige Lösung auf pH=5 mit HCl titriert.

Die Salzlösung wurde ohne Coelenterazin bei 4°C konserviert. Da das Substrat sehr sauerstoffempfindlich ist, wurde es frisch zur benötigten Menge Salzlösung hinzugegeben. Auf 10 ml Salzlösung wurden 16,94 µl Coelenterazin-Stammlösung ( $c = 0,00236 \text{ mol/l}$  in Ethanol) gegeben.

Beide Substratlösungen wurden 30 min. vor Gebrauch langsam auf RT gebracht. Die Coelenterazin-Stammlösung (Aufbewahrung bei -80°C) wurde erst nach der Aufwärmung hinzugegeben. Da erfahrungsgemäß das Coelenterazin verschiedener Hersteller unterschiedliche Signalintensitäten bewirken kann, wurde eine Lösung mit doppelter und vierfacher Substratkonzentration getestet.

Um zu überprüfen, ob die Signale des luminometrischen Assays mit den gewählten Bedingungen ausreichend groß genug sind, um für den Hochdurchsatz aussagefähig zu sein, wurde der Z-Faktor mit Hilfe der erhaltenen Messwerte für die Interaktion der 3'UTR von AGTR-1 und AGTR-2 mit der premiRNA-155 bestimmt. Der Z-Faktor ist ein Maß für die statistische Effektgröße. Die Formel lautet:

$$Z = 1 - 3 * \frac{3 * (\sigma p + \sigma n)}{|\mu p - \mu n|}$$

wobei  $\sigma$  = Standardabweichung,  $\mu$  = Mittelwert, p = Positivkontrolle, n = Negativkontrolle

Ein Wert zwischen 0,5 und 1 definiert einen verlässlichen Assay; ein Wert unter 0,5 sagt aus, dass das Verfahren mit den vorhandenen Parametern nicht aussagekräftig ist (Zhang, 1999).

#### 4.4.2 Verdünnungskurven, Temperatur- und Luftsauerstoffempfindlichkeit

Da das Luziferase/Luziferin-System sowohl im Falle von Firefly- wie auch von Renilla-Luziferase gegenüber Temperaturerhöhung bzw. Auftauvorgängen empfindlich ist, wurden luminometrische Assays mit und ohne vorhergehende Kryokonservierung durchgeführt. Dafür wurden HEK293/Flp-In-Zellen mit dem AGTR-1-3'UTR-Konstrukt in zwei Ansätzen transfiziert, nach 24 h lysiert (s.o.) und ein Ansatz zunächst eingefroren (-20°C). Der andere Ansatz wurde sofort zur Messung eingesetzt. Es wurde eine Konzentration von 3 pmol premicroRNA auf 12.500 Zellen gewählt, da bei dieser Menge wie oben gezeigt eine ausreichende Signalstärke erreicht und das RNA-Material gleichzeitig sparsam verwendet wird.

Die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse auch in bezug auf Kryostabilität kann durch die monotone Steigung einer Signalkurve in Abhängigkeit von der Zellzahl bzw. Enzymkonzentration beurteilt werden (vgl. Dual-Luciferase Reporter Assay System, Technical Manual, Fig.3, Promega).

Zu diesem Zweck wurden HEK293/Flp-In-Zellen mit dem 3'UTR-Konstrukt für AGTR-1 in abnehmender Konzentration als Quadruplikat in Luminometerplatten ausgesät (50.000 Zellen 1:2 in Reihe verdünnt, in je 100 µl Medium), nach erfolgter Adhäsion lysiert, bei -20°C eingefroren, nach 24 h aufgetaut und die Lumineszenz bei RT gemessen.

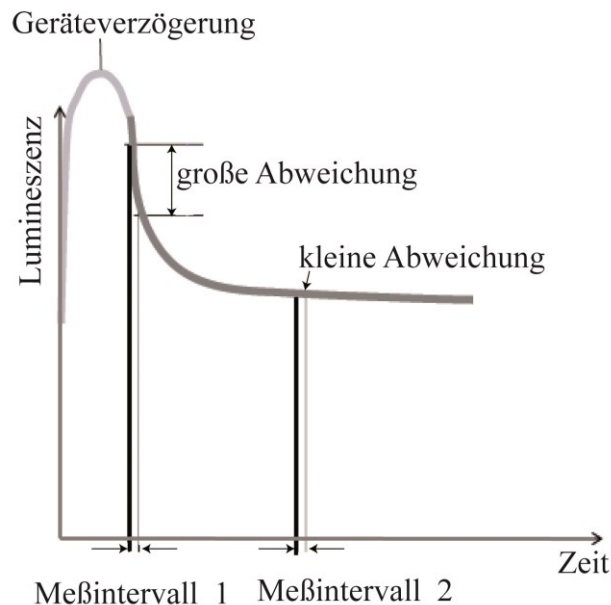
Darüberhinaus wurde ein Testversuch zur Automatisierung des Transfektionsverfahrens durchgeführt. Nach Desinfektion der Spritzschläuche mit 70%igem Ethanol und Reinstwasser wurden mit dem Luminometer auf in einer Luminometrieplatte 5 µl (7,5; 3,75; 1,88 pmol) manuell vorgelegte microRNA-Lösung 15 µl Transfektionsmedium (14,8 µl Opti-MEM + 0,2 µl Lipofectamine-RNAiMAX) gespritzt, kurz geschüttelt und im Dunkeln 15 min. bei RT inkubiert, um die Komplexierung von Liposomen und RNA zu erreichen. Währenddessen wurde eine

Zellsuspension mit der benötigten Konzentration hergestellt und in ein steriles Glasgefäß mit Magnetrührfisch überführt. Nach erneuter Desinfektion mit Alkohol und Wasser wurden die Zellen auf dem Magnetrührer vom Luminometer in 100 µl Suspensionsvolumen in je einen Napf der Luminometerplatte gepumpt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz gemessen.

#### **4.4.3 Optimierung des Hochdurchsatzverfahrens**

Die katalytische Umsetzung der Luziferasensubstrate D-Luziferin und Coelenterazin erfolgt nach einer enzymspezifischen Kinetik. Die Messung des Lumineszenz-Signals sollte möglichst in einem horizontal und geradlinigen Teil der Reaktionskurve verlaufen, um vergleichbare Ergebnisse der microRNA-Interaktionen zu erhalten (s. abb. 4.6). Daher wurden Kurven jeweils für die Firefly- und die Renilla-Reaktion aufgenommen.

Zu diesem Zweck wurden in eine Luminometerplatte je 50.000 Zellen als Triplikat pro Napf Flp-In-AGTR-1-Zellen eingesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden im Luminometer nach 15 min. passiver Lyse der Zellen zunächst 100 µl Firefly-, dann 100 µl Renilla-Substratpuffer durch manuelle Steuerung in die Näpfe gespritzt. Die Lumineszenzstrahlung wurde jeweils über einen Zeitraum von einer Minute alle 0,2 Sekunden gemessen. Für diese engmaschige Detektion wurde ein Glomax-Luminometer (Promega) genutzt, das für das Messprotokoll eine geeignete Steuerung besitzt.



**Abbildung 4.6 Luziferase-Reaktion im Luminometer: symbolische Darstellung einer Reaktionskurve.**

Nach maschineller Einspritzung des Substrates und einer kurzen Wartezeit bis zum Beginn der Reaktion (Geräteverzögerung) werden die luminometrischen Signale aufgezeichnet. Wird beispielsweise zu früh gemessen (Messintervall 1), fällt die Kurve gegenüber einem daneben liegendem Zeitpunkt steil ab, das Signal ist also deutlich niedriger. Wird hingegen später gemessen (Messintervall 2), ist der Signalunterschied gering. Eine Messung in diesem Bereich der Kurve ist daher weniger anfällig für leichte Unterschiede der Enzymkinetik in den Proben bzw. für Messungenauigkeiten des Luminometers.

## 4.5 microRNA-Interaktion und Validierung

### Material und Geräte:

HEK293-Flp-In-Zellen mit pc5/Psi-3'UTR-Konstrukten

s.o.

premicroRNA-Alexa555

life-technologies/ Ambion

humane premicroRNA-155

life-technologies/ Ambion

Lipofectamine-RNAiMAX

life-technologies/ Invitrogen

Opti-MEM Transfektionsmedium

life-technologies/ Invitrogen

DMEM mit 10% FKS

Biochrom

µClear 96well-Platten für Luminometrie

Greiner Bio-One

passiver Lysepuffer, 1:5 verdünnt (Wasser)

Promega

humane premicroRNA-Bibliothek

life-technologies/ Ambion

Small RNA Assay Kit für Bioanalyzer

Agilent

Wasser, RNase-frei	life-technologies/ Gibco
Bioanalyzer 2100	Agilent
Zellkulturroboter Selma	CyBio
Luminoskan Luminometer	LabSystems

#### 4.5.1 Nachweis der chemischen Stabilität der premicroRNA-Bibliothek

Da die microRNA-Bibliothek vor der Anwendung im Hochdurchsatz bereits zwei Jahre bei -20°C gelagert wurde, mußte die Qualität der Nukleinsäuren zunächst überprüft werden. Dies sollte mit einer fluorometrischen Gelelektrophorese im Bioanalyzer (Agilent) mit dem Kit für den smallRNA Assay durchgeführt werden.

Nach Anleitung des Herstellers wurde der DNA-Standard herunterzentrifugiert und zwei Min. bei 70°C erhitzt, auf Eis gekühlt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Das benötigte Aliquot wurde auf Eis aufgetaut.

Nach Aufwärmung von 650 µl Small RNA gel matrix auf 21°C wurde eine Zentrifugationsfilterung bei 10.000\* g für 15 Min. durchgeführt.

Der Farbstoff Small RNA dye wurde auf Raumtemperatur gebracht, gründlich gemischt und kurz anzentrifugiert. 2 µl der Lösung wurden in ein 500 µl-Reagiergefäß pipettiert. 40 µl gefiltertes Gel wurden hinzugefügt und gemischt bis zur Homogenität. Das Reagiergefäß wurde nun für zehn Min. bei 13.000\* g zentrifugiert. Anschließend wurden 9 µl Gel-Farbstoffmischung in einen neuen Small-RNA-chip auf der Chipstation pipettiert (Markierung „G“).

9 µl der Small RNA Konditionierungslösung wurden in die Markierung „CS“ pipettiert; gefolgt von 5 µl Small RNA Marker in der Markierung „Leiter“ und in jeder Probenöffnung.

miRNA-155-Proben aus der microRNA-Bibliothek und eine laborinterne siRNA-155 als Kontrolle wurden auf 70°C erhitzt (zwei Min.), um die Entstehung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. 1 µl der Leiter wurde in die Markierung „Leiter“ pipettiert. Je 1 µl der Proben-RNA (Triplikate von jeder RNA-Spezies) wurden in eine individuelle Öffnung pipettiert. Danach wurde der Chip eine Minute gründlich gemischt.

Anschließend wurde der Chip sofort in den Bioanalyzer eingelegt und der Lauf mit dem Programm „2100 expert“ gestartet.

#### 4.5.2 Hochdurchsatzverfahren: microRNA-Interaktion und Validierung

Die premicroRNA-Bibliothek umfaßte 477 einzelne humane microRNAs verteilt auf sechs 96well-Platten. Die absolute Menge pro miRNA-Spezies betrug 250 pmol. Mit einer Mehrkanalpipette wurden die Nukleotide in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst, um eine Konzentration von 5 pmol/µl zu erreichen. Danach wurden die Platten eingefroren.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden 3 pmol in 5 µl der miRNA-Lösungen mit Hilfe eines Zellkulturroboters unter sterilen Bedingungen in Luminometerplatten dispensiert. Dafür wurden die microRNAs zunächst weiter mit RNase-freiem Wasser verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,6 pmol/µl zu erhalten. Die Verteilung der einzelnen miRNA-Spezies auf sechs Platten wurde positionsgenau beibehalten.

Danach erfolgte sofort eine Kryokonservierung bei -20°C, um die RNA-Moleküle vor Abbau zu schützen.

Für die Transfektion wurden die dispensierten Platten aufgetaut und kurz zentrifugiert, um alle Flüssigkeit im Boden zu sammeln. Mit Hilfe des Luminometers wurden nun 15 µl Transfektionslösung (14,8 µl Opti-MEM, 0,2 µl Lipofectamine RNAiMAX) in jeden Napf gespritzt, kurz bei 350 U/min geschüttelt und die Platten mindestens 15 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert, um eine vollständige Komplexbildung von Liposomen und Nukleinsäuren zu erreichen.

Danach wurden mit dem Luminometer nach vorhergehender Sterilisierung der Spritzschläuche 100 µl Zellsuspension in jeden Napf gespritzt, die 12.500 Zellen enthielten. Für die Zelllinien mit den 3'UTR-Konstrukten von Oct-4, Nanog, Sox-2 und AGTR-1 wurden jeweils drei Triplikate der sechs dispensierten Platten der microRNA-Bibliothek hergestellt, so dass für jedes 3'UTR-Konstrukt 18 Platten in der Messung verwendet wurden. Nach einer Inkubation der Platten über 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die passive Lyse der transfizierten Zellen mit 20 µl 1:5 mit Reinstwasser verdünntem Lysepuffer auf dem Schüttler. Um die Luminometrie zu einem späteren Zeitpunkt durchführen zu können, wurden die Platten bei -20°C eingefroren.

Spätestens drei Tage nach der Kryokonservierung wurde die Luziferase-Aktivität in den Zelllysaten mit jeweils 100 µl Firefly- und Renillapuffer mit einer Verzögerung von sechs Sekunden und einer Meßzeit von zehn Sekunden bestimmt. Dazu erfolgte zunächst eine Temperierung der Lysate auf 21°C.

Die erhaltenen luminometrischen Werte wurden mit Hilfe einer z-Transformation standardisiert, um die Signale aller Proben vergleichbar zu machen (Anton et al., 2011). Diese Standardisierung bezieht den Mittelwert und die Standardabweichung der gesamten 96well-Luminometerplatte mit

ein. Die verwendeten Formeln lauten:

$$z_i = \frac{X_i - \bar{X}}{\sigma} \qquad X_i = \log \left( \frac{Ren_i}{Ffly_i} \right)$$

wobei  $z_i$  = z-Wert der Einzelmessung eines microRNA-Signals,  $\bar{X}$  = arithmetisches Mittel der Mikrotiterplatte (96w),  $\sigma$  = Standardabweichung der Mikrotiterplatte (96w), log = Logarithmus,  $Ffly_i$  = Firefly-Signal einer Einzelmessung,  $Ren_i$  = Renilla-Signal einer Einzelmessung

Die auf diese Weise ermittelten wirksamen microRNAs wurden beim Hersteller erneut bestellt und nach oben beschriebenem Protokoll in die fünf Zelllinien transfiziert und luminometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über den z-Wert.

#### 4.6 Bindungsanalyse der microRNA-335 und der microRNA-299-3p mit der mRNA von Oct-4

##### Material und Geräte:

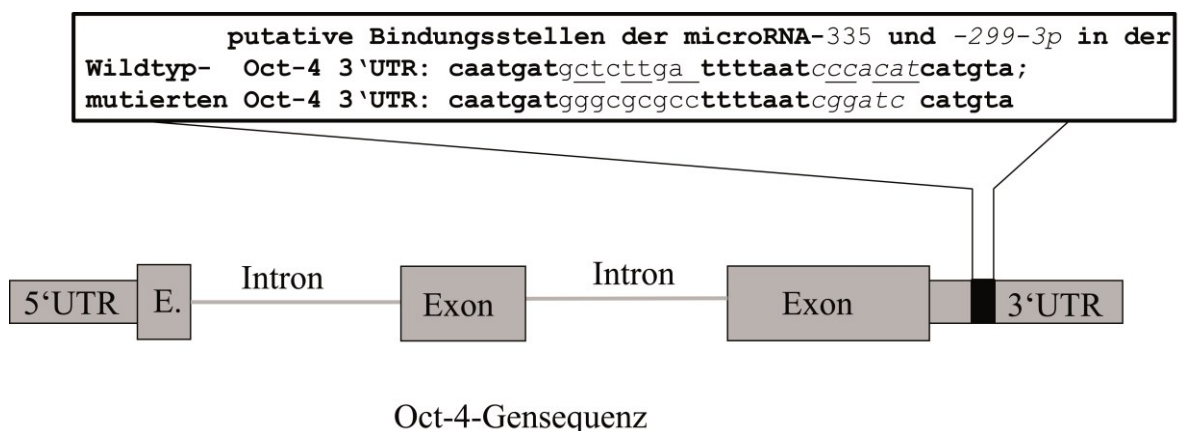
HEK293-Zellen	laborintern
pcDNA2.1-Oct4-3'UTR- mutiert	MWG Eurofins
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
humane premicroRNA -335, -299-3p	life-technologies/ Ambion
Lipofectamine-RNAiMAX	life-technologies/ Invitrogen
Roti-Fect	Roth
Opti-MEM Transfektionsmedium	life-technologies/ Invitrogen
DMEM mit 10% FKS (Teilmedium)	Biochrom
µClear 96well-Platten für Luminometrie	Greiner Bio-One
passiver Lysepuffer, 1:5 verdünnt (m. Wasser)	Promega
Luminometer Luminoskan	LabSystems

Um herauszufinden, in welchem Bereich der 3'UTRs wirksamsten microRNAs (miR-335, -299-3p) binden, wurden mit Hilfe des Internetdienstes Targetscan ([www.targetscan.com](http://www.targetscan.com)) die wahrscheinlichen Stellen ermittelt. Die potentiell bindenden Nukleotide wurden teilweise *in silico*

ausgetauscht (s. Abb. 4.7) und die so mutierte 3'UTR-Sequenz mit Restriktions-schnittstellen zum Einklonieren und zum Testverdau in den pc5/Psi durch einen Dienstleister synthetisiert.

Die erhaltene DNA wurde in den Vektoren pcDNA2.1 bzw. pGH integriert geliefert und zunächst durch Schnelltransformation in *E.coli* vermehrt (Protokoll 3). Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen XhoI und NotI-HF („High Fidelity“) wurde die mutierte 3'UTR-Sequenz vom Plasmidrückgrat getrennt (Protokoll 4, Puffer 4, BSA), gelelektrophoretisch aufgereinigt (Protokolle 5, 6) und in den aufgedauten pc5/Psi-Oct4 (XhoI und NotI-HF, Protokoll 4, Puffer 4, BSA), aus dem die Wildtyp-Oct-4-3'UTR entfernt wurde, einligiert (Protokoll 7). Der erhaltene Vektor mit der mutierten Sequenz wurde mit den Enzymen AscI und BspDI (Mutation für miR-335, Puffer 4, BSA, Protokoll 4) bzw. BamHI und SalI (Mutation für miR-299-3p, Puffer „Cutsmart“, Protokoll 4) testverdaut.

Die beiden Plasmide mit der mutierten 3'UTR von Oct-4 wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert. Dazu wurden 2 µg Vektor und 6 µl Roti-Fect mit jeweils 100 µl Basalmedium vermischt, die beiden Lösungen vereint und 15 min. inkubiert. Derselbe Ansatz wurde mit dem nicht mutierten Plasmid pc5/Psi-Oct4 als Kontrolle durchgeführt. Das Transfektionsmedium wurde zu 500.000 Zellen in einer 6well-Platte und 2 ml Medium mit FKS gegeben. Nach 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen trypsiniert und in eine Luminometer-Mikrotiterplatte (96w) mit einer Konzentration von 25.000 Zellen pro Napf eingesät. Nach weiteren 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde eine Transfektion der Zellen mit premicroRNA-335 und -299-3p durchgeführt (s. 3.6.1). Nach Inkubation über 24 h wurden die Zellen passiv lysiert (20 µl) und die Luziferase-Aktivität w.o. beschrieben luminometrisch bestimmt.



**Abbildung 4.7 Bioinformatisch vorhergesagte Bindungsstellen von microRNAs: Lage der Bindungsorte der miR-335 und -299-3p auf dem Gen von Oct-4 und mutierte Teilsequenz.**

Zu mutierende Nukleotide sind unterstrichen.



## 4.7 Funktioneller Test wirksamer microRNAs

### Material und Geräte:

#### Leuchtmedium:

RPMI 1640 ohne Phenolrot	Biochrom
10% FKS	Biochrom
1% Pen/Strep	Biochrom
1% HEPES	Biochrom
D-Luziferin 250 µM	Promega
Zelllinie NCC-IT-Oct4-Rep6	laboreigen/ Qiagen
Zelllinie Flp-In-AGTR1	laboreigen/ Qiagen
Zelllinie MDA-MB 231	Universitätsklinikum Jena, AG Onkologie
µClear 96well-Platten für Luminometrie	Greiner Bio-One
Lipofectamine RNAiMAX	life-technologies/ Invitrogen
Matrigel mit Phenolrot	Becton Dickinson
Fluoreszenzfarbstoff DY-630OH	Dyomics Jena
24well-Zellkulturplatten	Greiner
Zellchip Fluidik 221	microfluidic ChipShop Jena
Zellkulturmedium (RPMI 1640, FKS (10%), Penicillin/Streptomycin (1%))	Biochrom
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	life technologies/ AB
RNEasy Mini kit	Qiagen
High capacity cDNA Reverse Transcription kit	life/Applied
Luminaris Color HiGreen High Rox qPCR Master Mix	Thermo Scientific
Oligonukleotide/ Primer	Eurofins/MWG
Harnstoffpuffer	
Harnstoff 6M	Roth
Natriumorthovanadat Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1M	Roth
Natriumfluorid 1M	Roth
EDTA-Dinatrium-Dihydrat 1M	Roth
Triton X100 5 mg/ml	Roth
Pepstatin A 1 µg/ml	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 1M	Roth

Aprotinin 150 µg/ml	Roth
Rockland Blockpuffer 800-656-7625	Biomol
Bradford-Reagenz	Sigma
Laufpuffer (SDS-PAGE)	
Glyzin 250 mM	Roth
Tris-HCl 25 mM	Roth
SDS 0,1 %	Roth
Anodenpuffer (pH = 10,4)	
Tris 0,3 M	Roth
Methanol 10 %	Roth
Kathodenpuffer (pH = 9,4)	
Tris 25 mM	Roth
6-Amino-Hexansäure 40 mM	Roth
Methanol 10 %	Roth
TBST-Tween-Puffer (pH = 7,4)	
NaCl 8g/l	Roth
KCl 0,2 g/l	Roth
Tris 3 g/l	Roth
Tween 0,1 %	Roth
Acrylamid-Mischung 30% Rotiphoese Gel 30 (37,5:1)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS) pelletiert	Roth
Antikörper anti-human Oct3/4 (Isoform A und B) sc-5279 (IgG2b, Maus, monoklonal)	Santa Cruz
Antikörper anti-human Vinculin 4650 (Kaninchen, polyklonal)	Cell signaling technology
Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus 35568 (IgG, Infrarot, polyklonal)	ThermoFisher Scientific/ Pierce
Transfermembran K3BA7657B (PVDF)	Immobilon-FL/ Millipore
PageRuler unst. Protein ladder 78468	Thermo Scientific, Fermentas

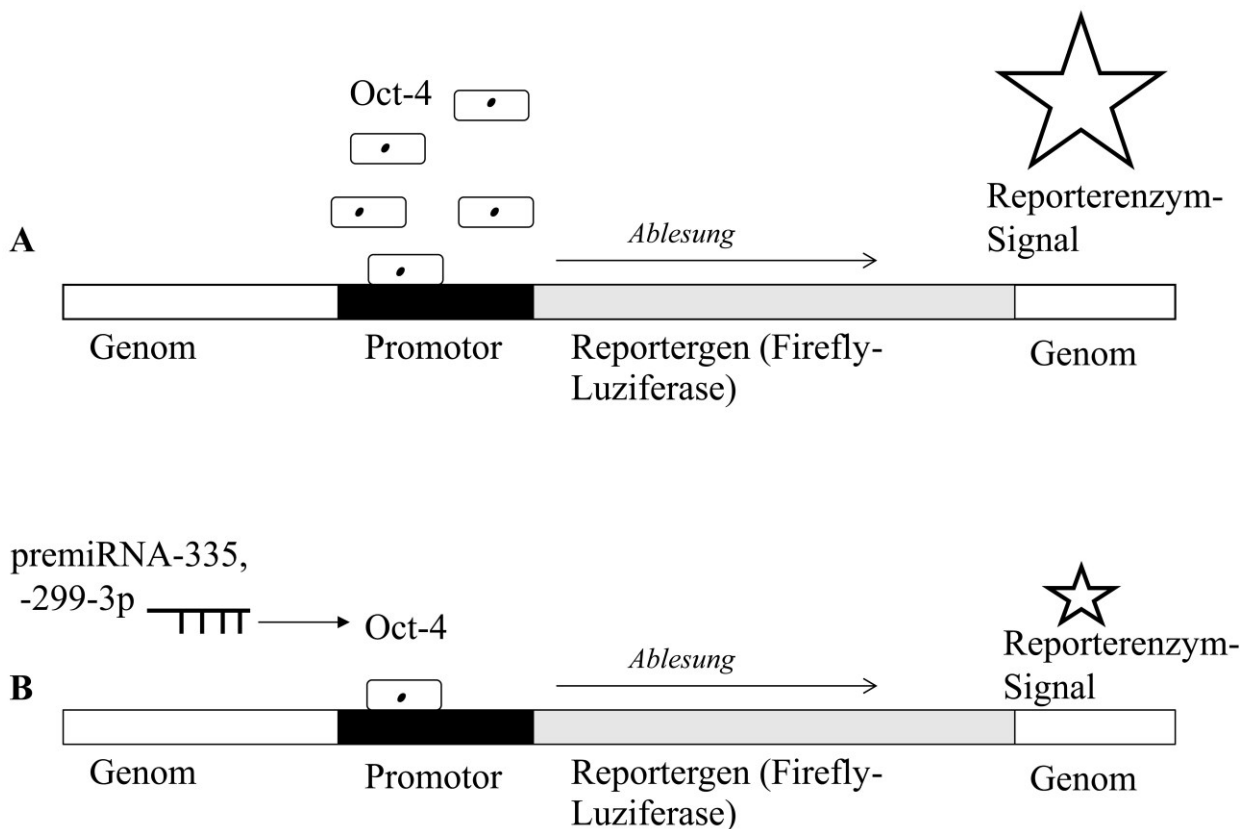
Fluoreszenz-Inversmikroskop	Zeiss Axiovision Z1
Luminometer Top Count	Packard
quantitative-PCR-Maschine StepOnePlus	life technologies/ Applied Biosystems
Infinite F200 Pro Mikroplatten-Lesegerät	Tecan
Photometer Nanodrop 8000	Thermo Scientific
Odyssey Infrarot-Bildgebungssystem	LI-COR Biosciences
Aida Imaga Analyzer v4.0	<a href="http://www.raytest.de/">http://www.raytest.de/</a>

#### 4.7.1 Langzeitmessung für microRNA-Interaktion in physiologischem Reporterassay

Um die gefundene auf Oct-4 wirksamen microRNAs-335 und -299-3p in einem anderen zellulären System zu überprüfen, wurde eine im Labor vorhandene Zelllinie mit einem genomisch integrierten HIV-abgeleiteten lentiviralen Reporterkonstrukt (Cignal, Qiagen) mit den pre-microRNAs-335, -299-3p, -155, und der Negativkontrolle transfiziert. Die Transgene bestehen aus einer Oct-4-responsiven Promotorsequenz und dem dahintergeschalteten Gen für die Firefly-Luziferase (s. Abb. 4.8). Das Gen für Oct-4 wird in der gewählten Teratom-Zelllinie NCC-IT-Oct-4 (Teshima et al., 1988) nativ exprimiert.

Für die Langzeitmessung wurden in einer Luminometer-Mikrotiterplatte (96w) je 12.500 Zellen pro Napf der lentiviral transfizierten Linie NCC-IT-Oct4-Rep4 als Oktoplikat mit 100 µl Leuchtmedium eingesät und jeweils mit 3 pmol pre-miRNA-335, -299-3p, -155 und –Negativkontrolle revers transfiziert (je 0,2 µl Lipofectamine RNAiMAX und 19,8-x µl Opti-MEM, x = Volumen der RNA-Lösung, s 4.4). Als Kontrolle wurde die Zelllinie Flp-In-AGTR-1 mit der 3'UTR von AGTR-1 auf dieselbe Weise revers transfiziert.

Das im Leuchtmedium enthaltene D-Luziferin konnte in die Zellen diffundieren und ermöglichte so eine kontinuierliche Luziferase-Reaktion. Die Messung erfolgte über fünf Tage alle drei Min. in einem temperierten Luminometer (37°C).



**Abbildung 4.8 Prinzip des physiologischen luminometrischen Reporterassays.**

Das in der transgenen Zelle exprimierte Oct-4 dockt am Promotorbereich des Reportergens an und bewirkt so die Herstellung von Luziferase. Eine in die Zelle transfizierte premiRNA-335(-5p) (bzw. premiRNA-299-3p) unterbindet oder verringert die Expression von Oct-4 und bewirkt so die Repression des Reportergens.

#### 4.7.2 Quantitative RT-PCR und Invasionsassays

Um den Einfluß von auf Oct-4 wirksame microRNAs zu untersuchen, wurde ein Invasionsassay mit Hilfe eines Zellchips durchgeführt. Dafür wurden hochmobile und invasive mammarkarzinom-abgeleitete MDA-MB-231-Zellen verwendet.

Die Oct-4-Expression dieser Zellen wurde im Vorfeld vergleichend mit Hilfe der halbquantitativen RT-PCR-Methode überprüft. Als Referenzen wurden die zuvor genutzte lentiviral transgene Zelllinie NCC-IT-Oct-4 und HEK293 verwendet. Eine primäre nephrologische Zelllinie, die als weitere Kontrolle betrachtet werden sollte, stand wegen zu geringer Zellzahlen (geringe Proliferationsrate) nicht zur Verfügung.

Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus etwa drei Mio. Zellen mit Hilfe des RNEasy Mini-Kits einschließlich DNaseI-Behandlung nach Vorschrift isoliert. Die Konzentration der erhaltenen

RNA-Lösung wurde fotospektrometrisch bestimmt. 2 µg Gesamt-RNA wurden anschließend zur Umschreibung in DNA mit Hilfe viraler Reverser Transkriptase nach Herstelleranweisung eingesetzt (High capacity reverse transcription kit, s. Tab. 4.9). Dabei wurden intronüberspannende Primer für humanes Oct-4 und das unregulierte Haushaltsgen PGK-1 (Cao et al., 2012) bioinformatisch konstruiert (Ncbi, Sequenzen s. Anhang, Tab. 9.4). Für die PCR wurden 10 ng cDNA pro Ansatz verwendet und für jede Zelllinie und jedes Gen sowohl drei biologische wie auch jeweils drei technische Replikate pipettiert. Die PCR wurde mit dem Luminaris Color HiGreen High Rox qPCR Master Mix durchgeführt.

**Tabelle 4.9 Ansatz und Programm der cDNA-Synthese und der quantitativen RT-PCR.**

<b>Ansatz reverse Transkription</b>		<b>Programm reverse Transkription</b>			
	µl	Schritt		Temp. °C	Dauer (Min.)
<b>RT-Puffer 2x</b>	2	<b>1</b>	<b>Equilibrierung Raumtemperatur</b>	25	10
<b>dNTP 25x (100 mM)</b>	0,8	<b>2</b>	<b>cDNA-Synthese</b>	37	120
<b>RT-Zufallsprimer 10x</b>	2	<b>3</b>	<b>Denaturierung cDNA-RNA</b>	85	5
<b>Reverse Transkriptase</b>	1	<b>4</b>	<b>Lagerung</b>	4	unbegrenzt
<b>RNase-Inhibitor</b>	1				
<b>cDNA 2 µg</b>	x				
<b>Wasser</b>	ad 20				
<b>gesamt</b>	20				
<b>Ansatz qPCR</b>		<b>Programm qPCR</b>			
	µl	Schritt		Temp. °C	Dauer (Sek.)
<b>Master Mix 2x (einschl. DNA-Pol.)</b>	5	<b>1</b>	<b>UDG Vorbehandlung</b>	50	120
<b>Vorwärtsprimer 10 µM</b>	0,3	<b>2</b>	<b>initiale Denaturierung DNA</b>	95	600
<b>Rückwärtsprimer 10 µM</b>	0,3	<b>3</b>	<b>Denaturierung DNA</b>	95	15
<b>DNA 10 ng</b>	1	<b>4</b>	<b>Hybridisierung</b>	60	30
<b>Wasser</b>	3,4	<b>5</b>	<b>Verlängerung</b>	72	30
<b>gesamt</b>	10	<b>6</b>	<b>Lagerung</b>	4	unbegrenzt
		Schritte 3-5 35 mal.			

Für den Invasionsversuch wurden die Kammern eines Fluidik-221-Chips zur Hälfte mit 100 µl Matrigel einschließlich Fluoreszenzfarbstoff DY-630-OH (c = 100 pg/ µl) befüllt und 15 Min. bei 37°C inkubiert, um das Matrigel gelieren zu lassen. In der Mitte der Kammern wurde neben der

Matrigelgrenze ein Luftauslaß, der werksseitig nicht vorhanden war, mit einer glühend erhitzten Filznadel gebohrt. Am Tag zuvor wurden invasive Zellen (MDA-MB 231) mit premicroRNA-335, -299-3p und –Negativkontrolle transfiziert (150 pmol und 400.000 Zellen pro Napf in einer 6w-Zellkulturplatte, siehe 4.4). Dann wurde eine Zellsuspension in einer Konzentration von 1000 Zellen/  $\mu$ l in die andere Hälfte der Chipkammern bis zum Matrigel gespritzt (Triplikat). Nach 48h wurden die Grenzflächen unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die Zahl der Invasionsereignisse ausgezählt.

Da microRNAs unvollständig mit einer mRNA hybridisieren, können Dutzende oder Hunderte von Zielgenen von einer einzigen microRNA (Wienholds und Plasterk, 2005) reguliert werden.

#### 4.7.3 Proteinblots

Um die verringerte Oct-4-Expression durch microRNAs auf Proteinebene zu untersuchen, wurden in einer 24w-Zellkulturplatte 62.500 NCC-IT-Oct4-Rep6-Zellen pro Vertiefung mit 0,75 $\mu$ l Lipofectamine-RNAiMAX und 15 pmol premicroRNA-335, -299-3p und –Negativkontrolle in Opti-MEM (ad 500  $\mu$ l) revers transfiziert (analog 4.4; jede Stimulation als Quadruplikat). Dieses Verfahren wurde nach jeweils 24 h zwei Mal wiederholt. Als technische Kontrollen wurden außerdem NCC-IT-Oct4-Rep6-Zellen mit 0,75 $\mu$ l Lipofectamine-RNAiMAX (ad 500  $\mu$ l Opti-MEM, als technische Kontrolle 1) und ohne spezifische Behandlung (als techn. Kontr. 2) kultiviert. Nach Überprüfung der degenerativen miRNA-Wirkung durch Sichtkontrolle im Inversmikroskop wurden nach drei Tagen die Zellen im Anschluß an einen Waschschrift mit PBS in 40  $\mu$ l Harnstoffpuffer lysiert. Mittels Zentrifugation (13.500\* g, 10 Min.) wurden durch Pelletierung Zelltrümmer entfernt. Mit dem Nanodrop-Spektrofotometer und vergleichend mit dem Bradford-Verfahren (990  $\mu$ l Bradford-Reagenz + 10  $\mu$ l Lysat, Messung bei  $\lambda$  = 595 nm gegen Basisabsorption des Reagenz) wurde der Proteingehalt in der Lösung bestimmt.

Zur Detektion des Oct-4-Proteins mit durch Isoformen bedingter Molekulargewichtbandbreite von 33-45 kDa (A: 45, B: 33kDa, siehe <http://datasheets.scbt.com/sc-5279.pdf>) wurde eine Konzentration von 10% für das Polyacrylamid-Gel zur Auftrennung gewählt (s. Tab. 4.9). Vinculin wurde als Ladekontrolle für die Gelelektrophorese verwandt.

**Tabelle 4.10 Herstellungsprotokoll für Polyacrylamidgele zur elektrophoretischen Proteinauftrennung.**

<b>jeweils auf 20ml</b>	<b>Reinstwasser</b>	<b>Rotiphorese Gel 30</b>	<b>Tris 1.5M (pH= 8,8)</b>	<b>10% SDS</b>	<b>10% Ammonium- persulfat</b>	<b>TEMED</b>
<b>für Trenngel (10%), in ml</b>	7,9	6,7	5	0,2	0,2	0,008
<b>für Sammelgel (5%), in ml</b>	13,6	3,4	2,5	0,2	0,2	0,02

Für die Elektrophorese wurden jeweils 40 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml verwandt. Für den Lauf der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 mV gewählt, die für den Lauf im Trenngel auf 100 mV erhöht wurde.

Für die Übertragung der aufgetrennten Proteine wurde im Blottinggerät Kathodenpuffer-getränkte PVDF-Transfermembran auf eingeweichtes Filterpapier gelegt und mit dem in Anodenpuffer equilibrierten Gel und drei Filterpapieren bedeckt. Pro cm<sup>2</sup> Gelfläche wurde eine Spannung von 2,5 mA 60 Min. lang angelegt.

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran in Blockpuffer 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten drei Waschschritte in TBST-Tween-Puffer. Über Nacht wurde die Membran dann bei 4°C mit den zwei Primär-Antikörperlösungen (gegen Oct-4, Isoform A und B, und Vinculin, 1: 100.000 in TBST-Tween-Puffer) inkubiert. Zu diesem Zweck wurde die Lage der entsprechenden Banden anhand des Proteinstandards abgeschätzt und die Membran in zwei Teile zerschnitten, um die unterschiedlichen Banden mit dem jeweiligen Antikörper hybridisieren zu können.

Nach Bindung der Antikörper wurden diese durch Waschen entfernt und ein Infrarot-Chromophor tragender Sekundärantikörper in Lösung auf die Membran gegeben. Um die Detektionssensitivität zu erhöhen, wurden zwei Wellenlängen ( $\lambda = 700$  und 800 nm) gemessen.

In zwei experimentellen Durchläufen wurden jeweils zwei Replikate mit Lysaten von mit premicroRNA-335 bzw. -299-3p und –Negativkontrolle transfizierterter Zellen auf ihren Oct-4-Gehalt untersucht; außerdem jeweils ein Replikat der technischen Kontrollen 1 und 2. Die Infrarotsignale der hybridisierenden Sekundärantikörper wurden mit einem Dokumentationsgerät detektiert und als digitalisiert. Die Signalbanden in den erhaltenen Dateien wurden densitometrisch mit dem Aida-Image Analyzer-Programm vermessen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Western-Blot-Analysen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Xinlai Cheng (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Pharmazeutische Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) durchgeführt.

#### 4.8 Statistische Absicherung der Ergebnisse

Die statistische Analyse der Daten in der vorliegenden Arbeit wurde nach Beratung mit dem Institut für Medizinische Statistik Informatik und Dokumentation (IMSID) des Universitätsklinikums Jena und dem Institut für Mathematik der Humboldt-Universität zu Berlin vorgenommen.

Bei Mittelwertanalysen wurde als Streuungsmaß der Standardfehler (SF) mit der Formel

$$SF = \frac{\textit{Standardabweichung der Werte}}{\sqrt{\textit{Anzahl der Werte}}}$$

genutzt (Müller, 1991). Der Standardfehler gibt an, wie gut sich der Stichproben-Mittelwert dem Mittelwert der theoretischen Gesamtpopulation annähert.

Zur Überprüfung der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte zweier verschiedener Proben wurde ein statistischer Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney (U-Test) (Wilcoxon, 1945; Mann and Whitney, 1947) durchgeführt.

Zur Überprüfung der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte von mehr als zwei verschiedenen Proben wurden einfaktorielle bzw. zweifaktorielle nichtparametrische Teste nach Kruskal und Wallis (H-Test) (Kruskal and Wallis, 1952) bzw. nach Scheirer, Ray und Hare (SRH-Test) (Scheirer et al., 1976) durchgeführt. Diese parameterfreien Verfahren sind robust bei der statistischen Beurteilung Datensätzen, die nicht normalverteilt sind. Zusätzlich zum H-Test wurden paarweise Gruppenvergleiche mit einem Post-hoc-Test durchgeführt (Dunn-Bonferroni).

Bei allen genutzten statistischen Testverfahren außer Dunn-Bonferroni wurde als maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit ein p-Wert von 5% gewählt

([http://qed.econ.queensu.ca/walras/custom/300/351B/notes/glo\\_07.htm#pvalue](http://qed.econ.queensu.ca/walras/custom/300/351B/notes/glo_07.htm#pvalue)).

Für das luminometrische Verfahren zur Ermittlung von Stammzellgen-microRNA-Interaktionen (s. 3.7.2 und 4.5.2) wurde eine z-Statistik nach dem Vorbild einschlägiger Literatur (Anton et al., 2011) durchgeführt, die eine bessere Auswertung (im Sinne des Rankings) und statistische Beurteilung für die Hochdurchsatzdaten ermöglichte.



## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Design und Klonierung von Reporter-gen-3'UTR-Plasmidvektoren**

Aus den beiden Plasmiden pPsiCHECK-2 und pcDNA5/FRT wurde über einen Zwischenschritt, den Einbau einer Adaptersequenz in beiden Vektoren, ein Grundvektor (pc5/Psi) ligiert, der sowohl die beiden Luziferasesequenzen aus dem pPsiCHECK-2 als auch die Rekombinationsstelle (FRT) des pcDNA5/FRT enthielt. Der erhaltene Grundvektor wurde durch einen diagnostischen Verdau mit den Restriktionsenzymen PacI und EcoRI nachgewiesen (s. Anhang, Abb. 8.1).

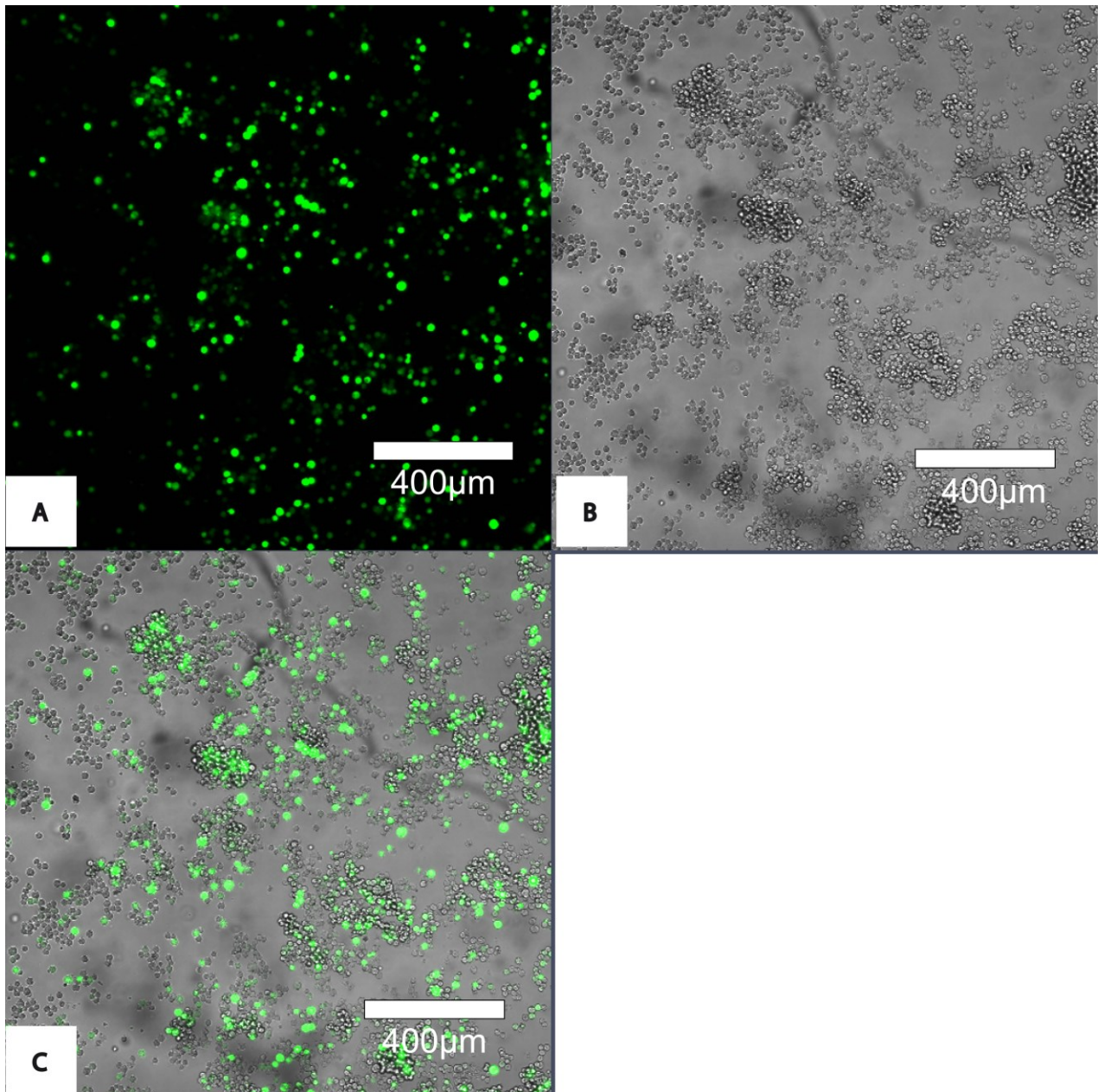
Der Grundvektor pc5/Psi und die mit PCR gewonnenen 3'UTR-Sequenzen einschließlich Überhängen wurden mit Restriktionsenzymen aufgedaut und zusammenligiert. Die korrekte Basenabfolge der erhaltenen Vektoren konnte durch Sequenzierung nachgewiesen werden (s. Anhang Abb. 8.2).

### **5.2 Stabile Transfektion von HEK293-FRT-Zellen mittels homologer Rekombination**

Die Integration der 3'UTR-tragenden pc5/Psi-Vektoren durch das Rekombinationsenzym Flippase in das Genom der Flp-In-Zellen wurde durch eine PCR mit Temperaturgradient nachgewiesen. Es wurden je sechs bzw. sieben Reaktionen mit den Temperaturen 54, 56, 58, 60, 62, 64 und gegebenenfalls 66°C gefahren.

### **5.3 Überprüfung der Transfektion mit microRNA**

HEK293-Flp-In-Zellen mit dem integrierten pc5/Psi-AGTR-1-Konstrukt wurden mit Alexa555-gekoppelter microRNA transfiziert und mikroskopiert. Es zeigte sich, dass die Zellen die markierte RNA in ausreichender Zahl aufgenommen haben (s. Abb. 5.1).



**Abbildung 5.1 Effizienz der Transfektion mit Alexa555-gekoppelter RNA.**

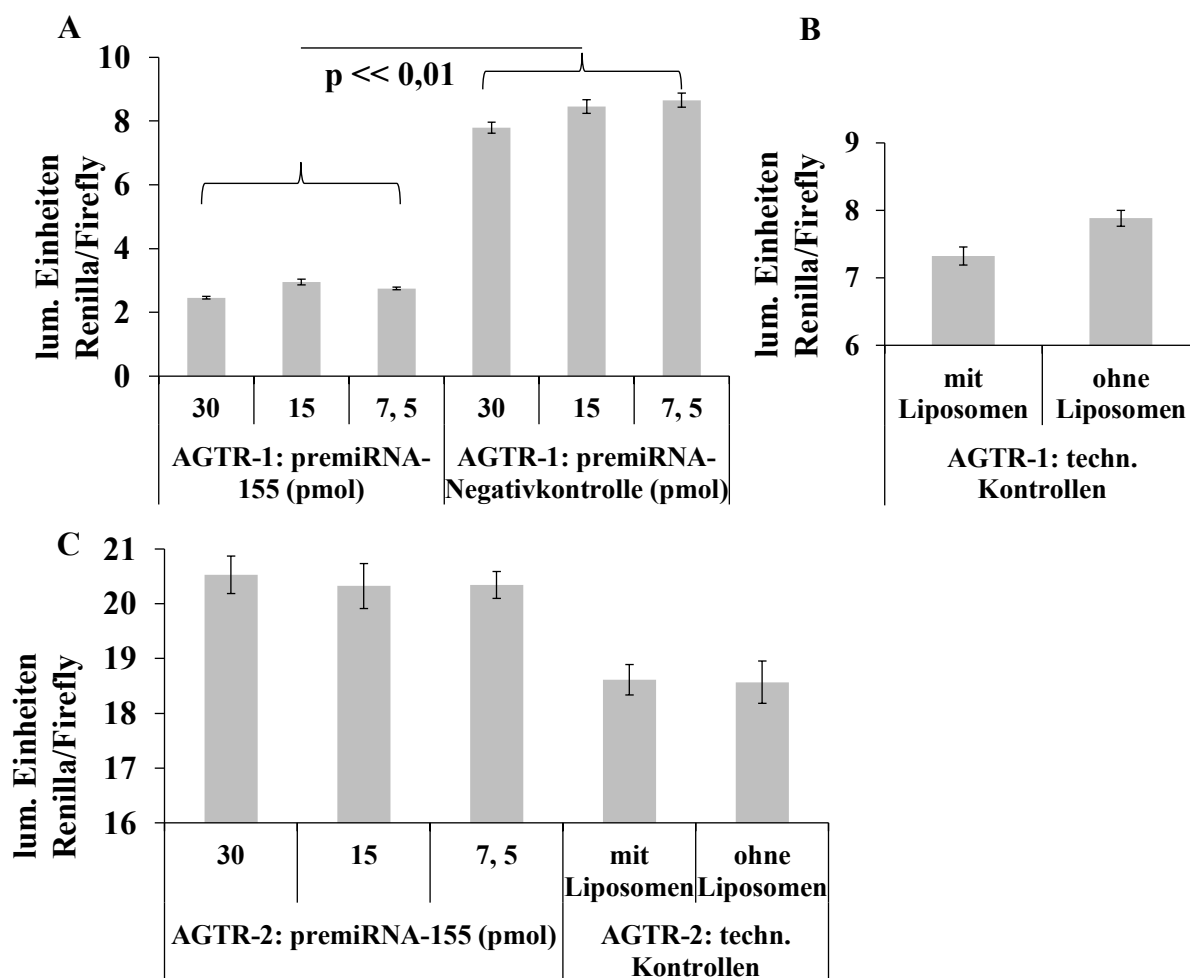
A: Fluoreszenzbild, B: Durchlichtaufnahme der Zellen, C: Überlagerung von A und B. Falschfarbenaufnahme mit 10x Objektiv. 39,5% Prozent der Zellen zeigen ein deutliches Fluoreszenzsignal.

## 5.4 Optimierung des Dual-Luziferase-Assays

### 5.4.1 Luminometrisches Protokoll und günstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis

HEK293-Zellen mit den pc5/Psi-AGTR-1- und -AGTR-2-Konstrukten wurden in der Konzentration 50.000/ Napf mit premicroRNA-155 in verschiedenen Konzentrationen als Hexaplikate transfiziert. Nach 24 h wurde die Lumineszenz der zellulären Luziferasen im Luminometer mit der voreingestellten Verzögerung nach Substratpuffereinspritzung von zehn Sekunden bestimmt. Die Messzeit betrug ebenfalls zehn Sekunden. Zunächst wurde eine vierfache Konzentration von Coelenterazin im Renillapuffer verwendet. Aus den erhaltenen Rohwerten wurden Mittelwerte der Hexaplikate errechnet und anschließend der Quotient von Renilla- und Firefly-Aktivität gebildet. Eine mögliche Herabregulation des Renilla-Reportergens kann an verkleinerten Quotienten gegenüber den Kontrollen abgelesen werden.

Es zeigte sich, dass unabhängig von der verwendeten RNA-Menge das Signal der Renilla-Luziferase durch die premicroRNA-155 in den AGTR-1-Zellen gegenüber den Kontrollen deutlich vermindert wurde (s.Abb. 5.2). Der Z-Faktor zur Beurteilung der Verfahrensqualität hatte bei allen Konzentrationen einen Wert von  $> 0,5$ ; unter den gegebenen Bedingungen ist das Verfahren demnach für den Hochdurchsatz gut geeignet.



### Abbildung 5.2 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1.

A. Die Renilla-Expression in Zellen mit der 3'UTR wird durch Bindung der premicroRNA-155 herabreguliert gegenüber Zellen mit premiRNA-Negativkontrolle und untransfizierten Zellen.

Statistik (A, mit Standardfehler):  $n = 6$ . Angegebener p-Wert für Unterschied zwischen miRNA-Spezies: zweifaktorieller nichtparametrischer SRH-Test. p-Werte für Unterschiede: miRNA-Spezies:  $p = 4,67 \cdot 10^{-14}$  (im Bild); konzentrationsabhängig:  $p = 5,44 \cdot 10^{-5}$ ; miRNA-Spezies im Vergleich zu Konzentration:  $p = 0,7502$ .

B. Technische Kontrollen zum Vergleich.

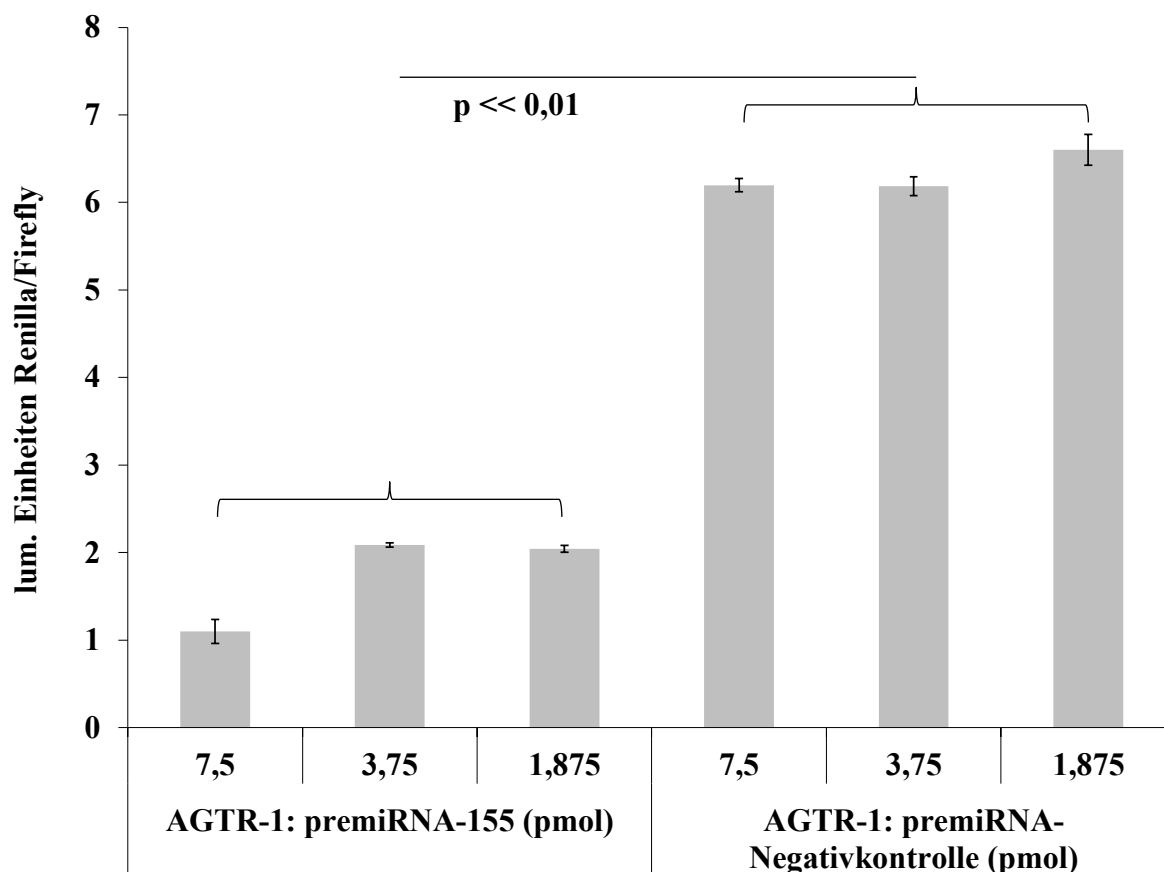
C. In der AGTR-2-3'UTR-tragenden Vergleichszelllinie konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Statistik (A, mit Standardfehler):  $n = 6$ .

Durch Z-Faktorberechnung wurde eine ausreichende Qualität des Hochdurchsatzverfahrens festgestellt. Wert des Z-Faktors (AGTR-1: premiRNA-155 gg. premiRNA-Negativkontrolle) bei 30 pmol: 0,67; bei 15 pmol: 0,55; bei 7,5 pmol: 0,65 (notwendiges Minimum:  $Z > 0,5$ ).

Um für den Hauptversuch eine geringere Menge der kostenintensiven microRNAs verwenden zu können, wurde getestet, ob eine Konzentration von 3,75 bzw. 1,88 pmol/ 120  $\mu$ l Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß (Vertiefung einer Mikrotiterplatte, 96w) der premicroRNA-155 ausreichte, um die beobachtete Herabregulation des Reporters hervorzurufen. Um außerdem mit einer geringeren Zellzahl arbeiten zu können, wurde die Transfektion mit 12.500 Zellen (Hexaplikate) wiederholt. Es zeigte sich, dass bei diesen Konzentrationen die Reprimierung der Renilla-Luziferase gegenüber 7,5

pmol premicroRNA-155 etwas geringer, aber dennoch deutlich gegenüber den Kontrollen ausfiel. Die luminometrische Messung zeigte auch hier eine deutliche Herabregulation des Renilla-Reporters. Der Z-Faktor hatte hier erneut einen Wert von  $> 0,5$  (s. Abb 5.3).



**Abbildung 5.3 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1.**

Die Renilla-Expression in Zellen mit der 3'UTR wird durch Bindung der premicroRNA-155 herabreguliert gegenüber Zellen mit premiRNA-Negativkontrolle und untransfizierten Zellen, hier mit verringerter Zellzahl (12.500/ Ansatz).

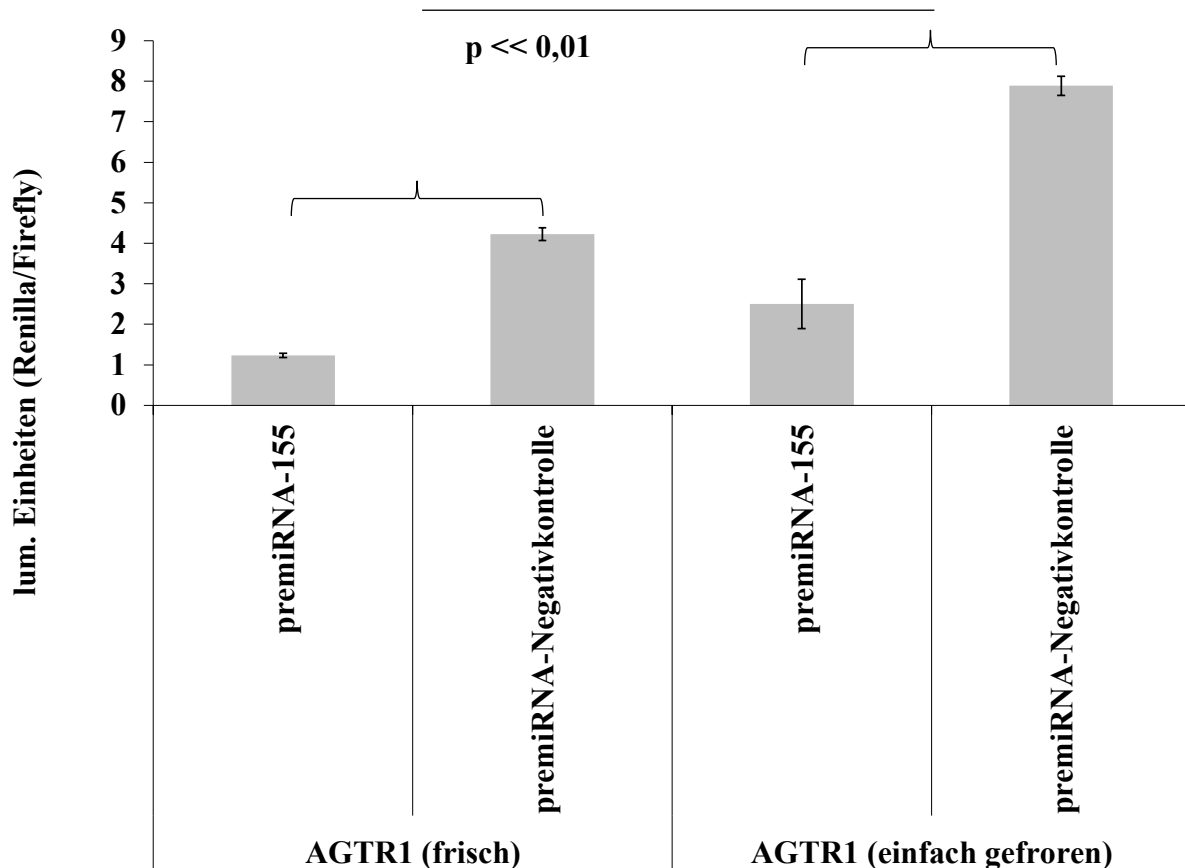
Statistik (mit Standardfehler):  $n = 6$ . p-Wert für Unterschied zwischen miRNA-Spezies: zweifaktorieller nichtparametrischer SRH-Test. p-Werte für Unterschiede: miRNA-Spezies:  $p = 2,76 \cdot 10^{-14}$  (im Bild); konzentrationsabhängig:  $p = 3,2 \cdot 10^{-4}$ ; miRNA-Spezies im Vergleich zu Konzentration:  $p = 0,017$ .

Durch Z-Faktorberechnung wurde eine ausreichende Qualität des Hochdurchsatzverfahrens festgestellt. Wert des Z-Faktors bei premicroRNA-155, 7,5; 3,75; 1,875 pmol: 0,67; 0,73; 0,6 (notwendiges Minimum:  $Z > 0,5$ ).

#### 5.4.2 Verdünnungskurven, Temperatur- und Luftsauerstoffempfindlichkeit

Für die Messung der Reporteraktivität im Hochdurchsatz sollten die verschiedenen mit

premicroRNA transfizierten Zelllinien kryokonserviert werden, um den Arbeitsablauf zu rationalisieren und stets gleiche Bedingungen im Vorfeld der Luminometrie zu gewährleisten. Auch hier zeigte sich eine deutliche Herabregulation der Renilla-Reporterexpression gegenüber den Kontrollen in beiden Ansätzen (s. Abb. 5.4)



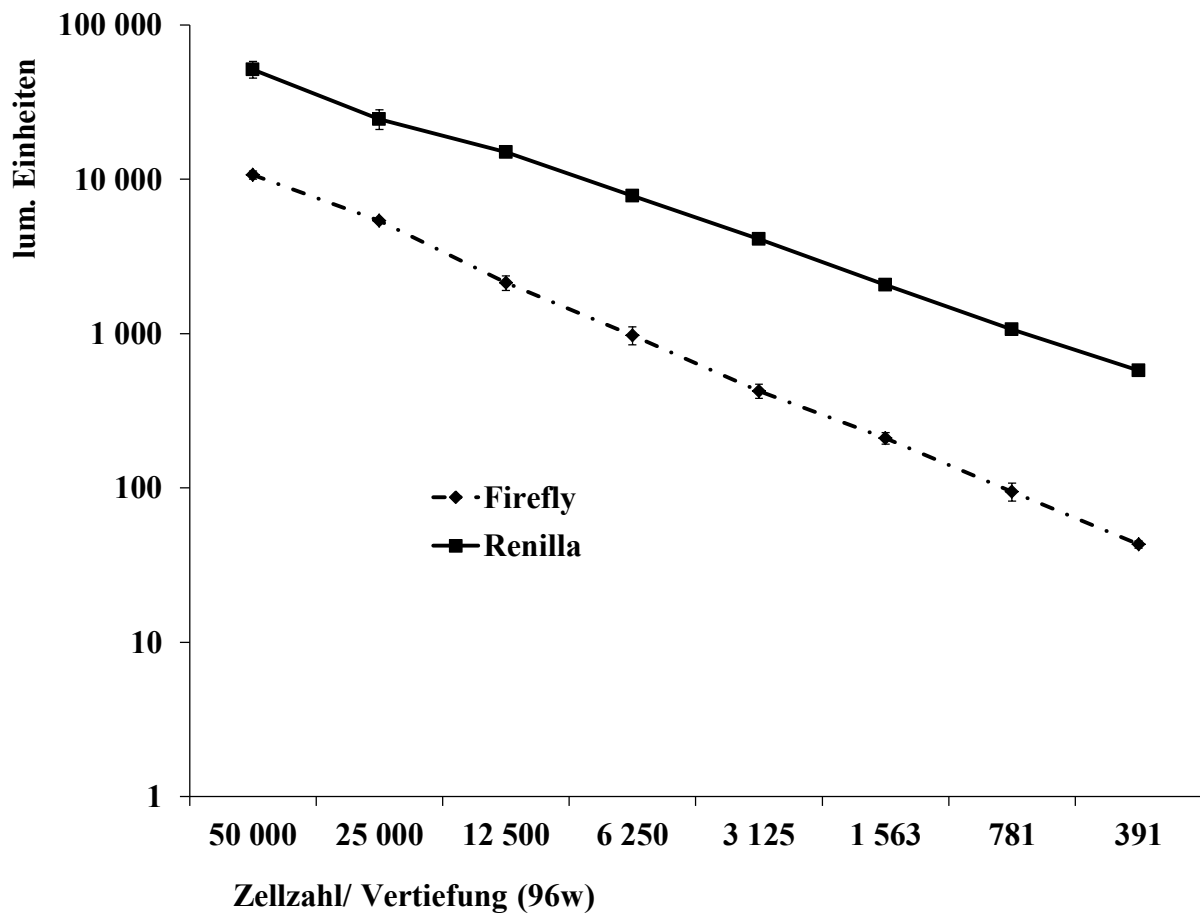
**Abbildung 5.4 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1 in frischen und einmal gefrorenen Ansätzen.**

Das Reporterenzym in den kryokonservierten Zellysaten zeigt keine signifikanten Aktivitätsunterschiede gegenüber den Kontrollen. Daher können die Zellysate vor der luminometrischen Analyse konserviert werden.

Verwendete Menge RNA: 3 pmol pro Ansatz. Statistik (mit Standardfehler):  $n = 6$ . p-Wert für Unterschied zwischen miRNA-Spezies: zweifaktorieller nichtparametrischer SRH-Test. p-Werte für Unterschiede: miRNA-Spezies:  $p = 1,54e^{-7}$  (im Bild); konzentrationsabhängig:  $p = 1,02e^{-12}$ ; miRNA-Spezies im Vergleich zu Konzentration:  $p = 1$ .

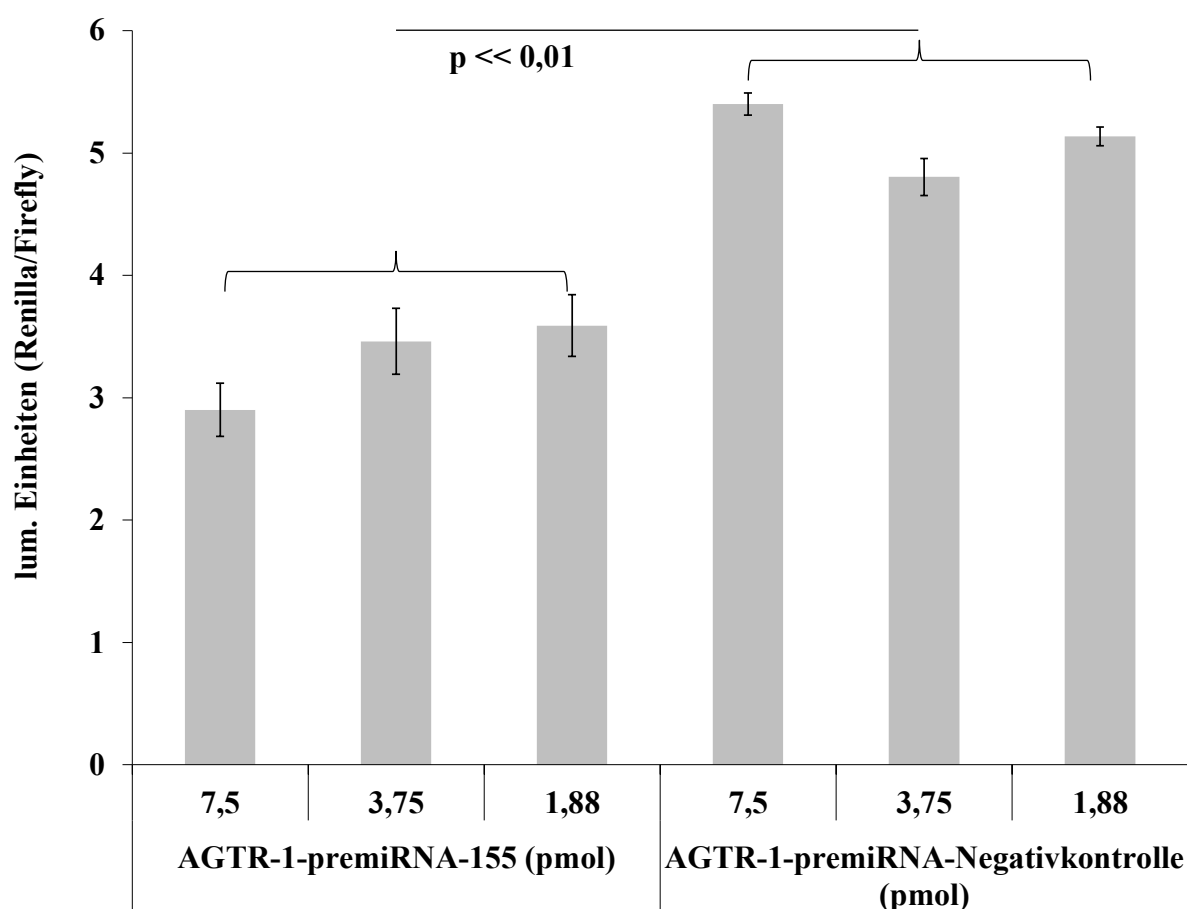
Die Robustheit einer enzymatischen Reaktion sollte außerdem durch eine Verdünnungskurve überprüft werden. Die Lumineszenzwerte 1:2 verdünnter HEK293-Flp-In-Zellen mit AGTR-1-3'UTR wurden logarithmisch aufgetragen. Sowohl die Kurve für das Firefly- wie auch das Renilla-Enzym besaßen annähernd eine monotone Steigung, das heißt, eine Halbierung der Zellzahl halbierte auch angenähert das Lumineszenz-Signal (s. Abb. 5.5).

Daher konnten im Hauptversuch einmal gefrorene Zellen verwendet werden.



**Abbildung 5.5** Strenge Monotonie der Verdünnungskurven in doppelt-logarithmischer Darstellung am Beispiel der Zelllinie HEK293/Flp-In mit AGTR-1-3'UTR.

Die Transfektion und Einsaat der HEK293/Flp-In-Zellen mit den 3'UTR-Konstrukten sollten für den Hochdurchsatzassay maschinell mit Hilfe des Luminometers durchgeführt werden. Die Herabregulierung der Renilla-Luziferase in AGTR-1-3'UTR-tragenden Zellen durch die premiRNA-155 konnte nachgewiesen werden; allerdings waren die Standardfehler der einzelnen Mittelwerte recht hoch (s.Abb. 5.6).



**Abbildung 5.6 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1 in maschinell eingesäten Zellen.**

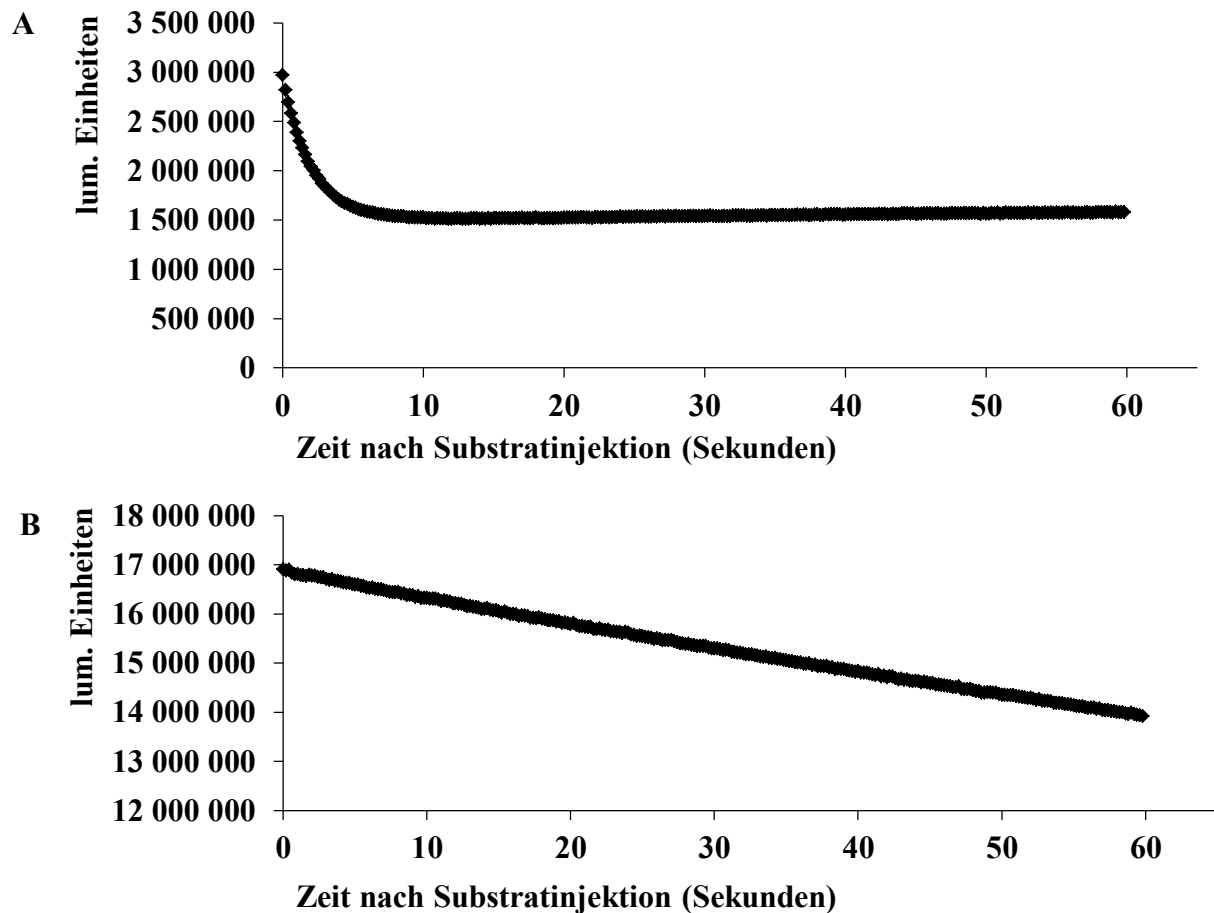
Statistik (mit Standardfehler):  $n = 6$ . p-Wert für Unterschied zwischen miRNA-Spezies: zweifaktorieller nichtparametrischer SRH-Test. p-Werte für Unterschiede: miRNA-Spezies:  $p = 1,339e^{-11}$  (im Bild); konzentrations-abhängig:  $p = 0,25$ ; miRNA-Spezies im Vergleich zu Konzentration:  $p = 0,0075$

#### 5.4.3 Kurze Gesamtmeßzeit im Hochdurchsatzverfahren und Auswahl eines günstigen Meßintervalls

Die Enzymkinetik der Firefly- und der Renilla-Luziferase wurde mit Hilfe lysierter HEK293/Flp-In-AGTR-1-Zellen bestimmt. Die Kurven der beiden Enzyme zeigten unterschiedliche Verläufe: Die Aktivität der Firefly-Luziferase fiel nach der Substrateinspritzung massiv ab, um etwa fünf Sekunden nach Beginn der Reaktion auf konstantem Niveau zu verbleiben. Die Aktivität der Renilla-Luziferase hingegen fiel nach Einspritzung weniger stark, dafür aber kontinuierlich ab (s. Abb. 5.7). Daher wurde für das Hochdurchsatzverfahren eine Messverzögerung von sechs Sekunden und eine Integrationszeit (Messintervall) von zehn Sekunden gewählt. Diese Parameter ermöglichten eine recht kurze Messzeit für jede Luminometerplatte von mindestens 48 Min. und



gleichzeitig ein günstiges Messintervall im horizontalen Bereich der Firefly-Kurve.



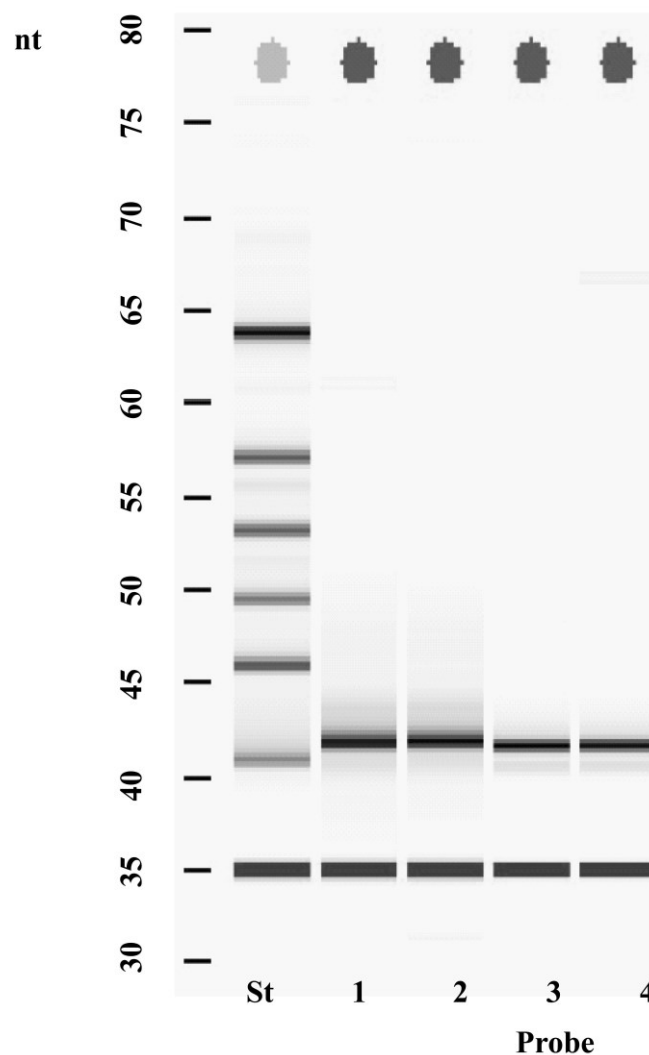
**Abbildung 5.7 Enzymkinetische Kurven aus den gemittelten Messwerte der Firefly- (A) und der Renilla-Luziferase (B).**

Die im Vergleich zu anderen Abbildungen hohen luminometrischen Werte rühren von der Einstellung des Photomultiplikators im Glomax-Luminometer her.

## 5.5 miRNA-Interaktion und Validierung

### 5.5.1 Nachweis der chemischen Stabilität der microRNA-Bibliothek

Das Steuerungs- und Auswertungsprogramm des Bioanalyzers „2100 expert“ liefert automatisch die fluorometrische und gelelektrophoretische Auswertung der microRNA-Analyse. Dabei wurde festgestellt, dass die premiRNA-155 aus der zu verwendenden Bibliothek nicht abgebaut wurde (s.Abb. 5.8).



**Abbildung 5.8 Fluorometrische und gelelektrophoretische Analyse der premiRNA-155 aus der miRNA-Bibliothek.**

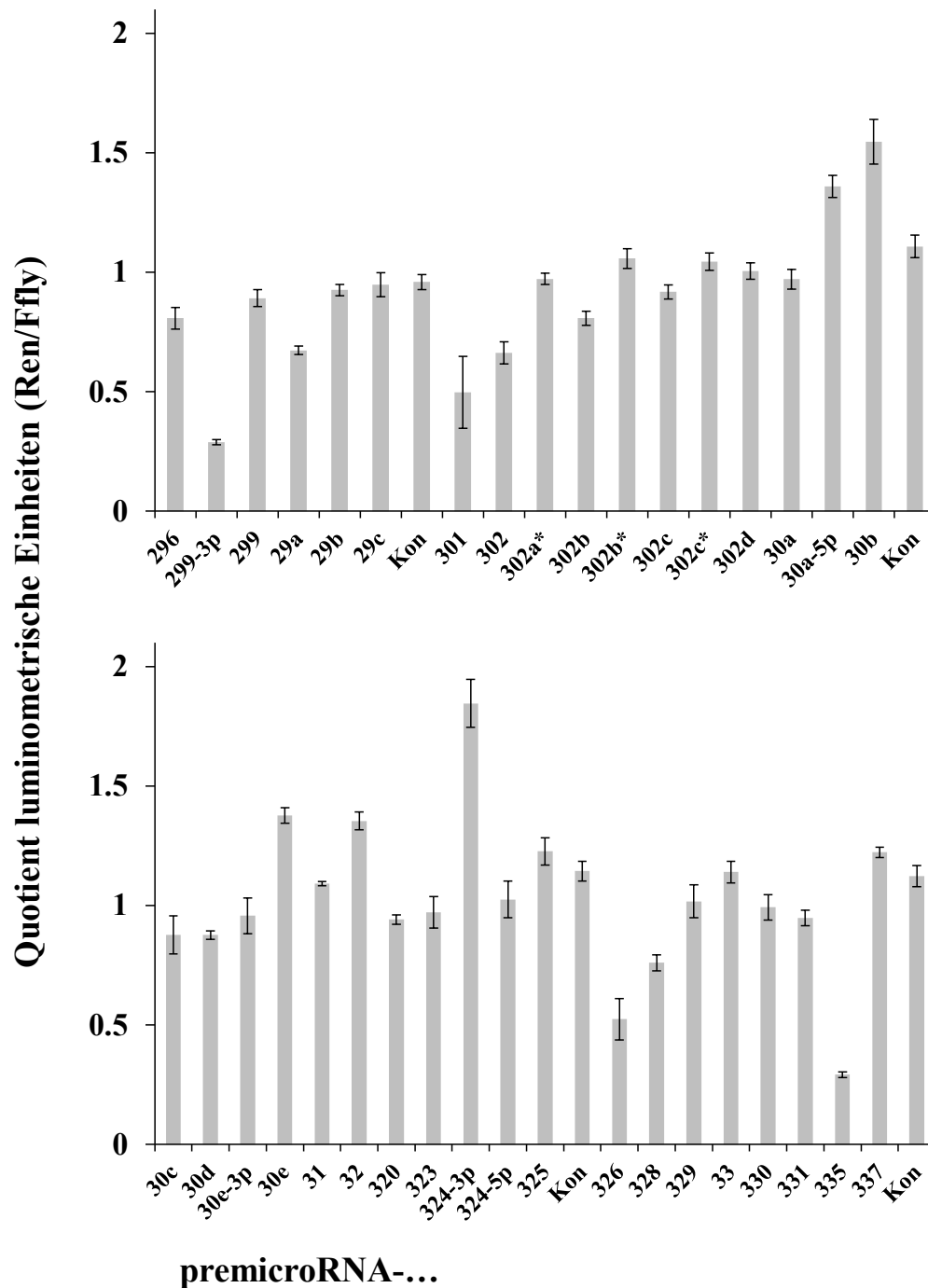
Ergebnis der Gelelektrophorese. Auf Position 1 und 2 sind die Banden der siRNA-155 (Duplikat), auf Position 3 und 4 die Banden der premiRNA-155 bei jeweils 42 nt zu sehen (bei 35 nt der interne Standard). St: Referenzbanden.

### 5.5.2 Hochdurchsatzverfahren: microRNA-Interaktion und Validierung

Für die Zelllinien mit den 3'UTR-Konstrukten von Oct-4, Nanog, Sox-2 und AGTR-1 wurden jeweils Triplikate der sechs dispensierten Platten der microRNA-Bibliothek pipettiert.

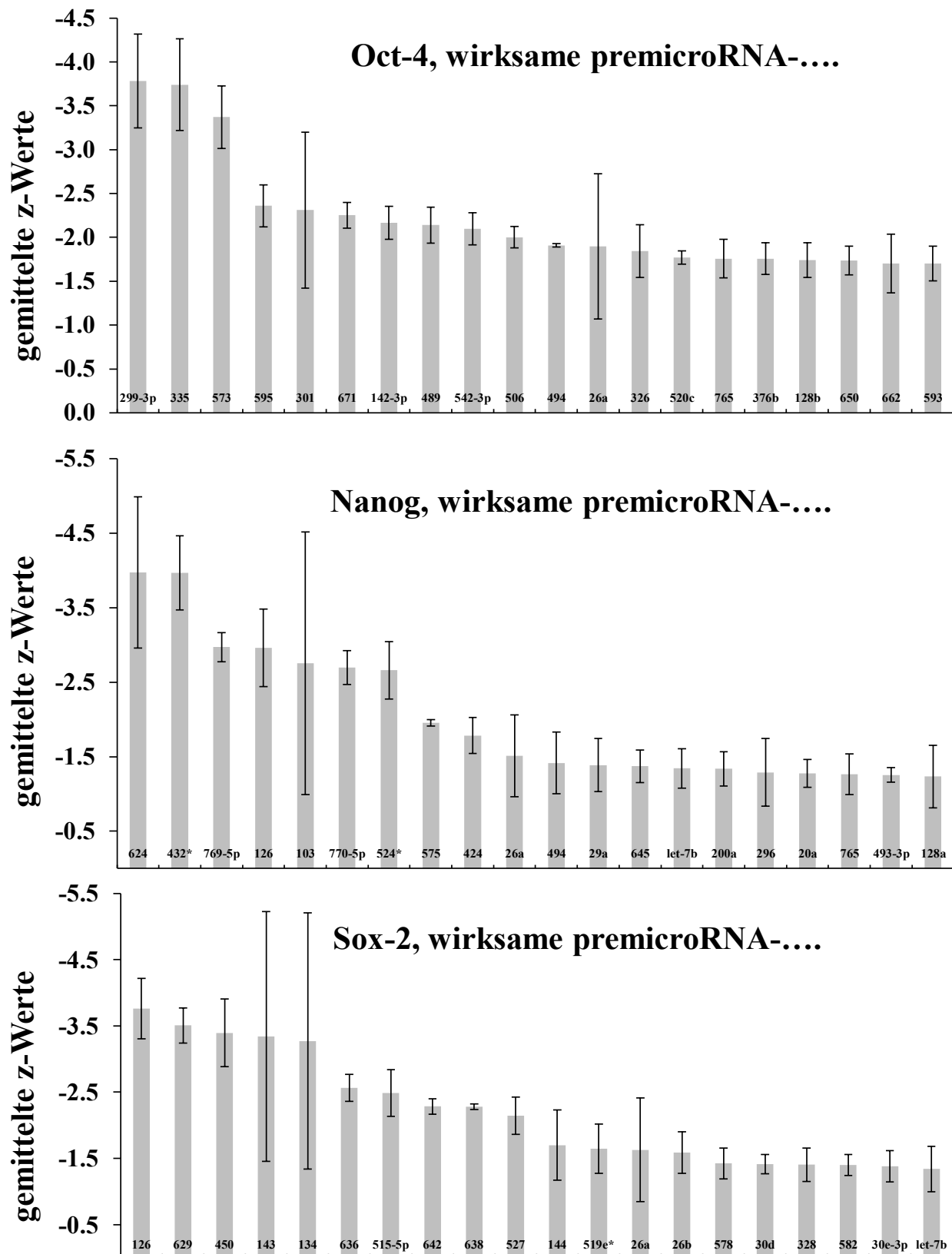
Die erhaltenen luminometrischen Messwerte wurden plattenweise z-transformiert. Die errechneten z-Werte für jede microRNA und 3'UTR lagen demnach als Triplikat vor. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Ranking der jeweils wirksamsten microRNAs: Die drei z-Werte des Triplikates wurden arithmetisch gemittelt und darauf basierend der Rang ermittelt. Es wurden für jedes Gen drei bis neun micro-RNA-Spezies gefunden, die sich im ersten Durchgang und im

Validierungsassay nach z-Wert unter den 20 wirksamsten Molekülen befanden. Dabei waren die microRNAs 299-3p und 335 für Oct-4 in allen Rankings die beiden effektivsten; dasselbe gilt für die miRNAs 126, 450, 636 und Sox-2 (s. Abb. 5.9).



**Abbildung 5.9 A Validierte mit den stammzelltypischen Genen wechselwirkende pre-microRNAs.**

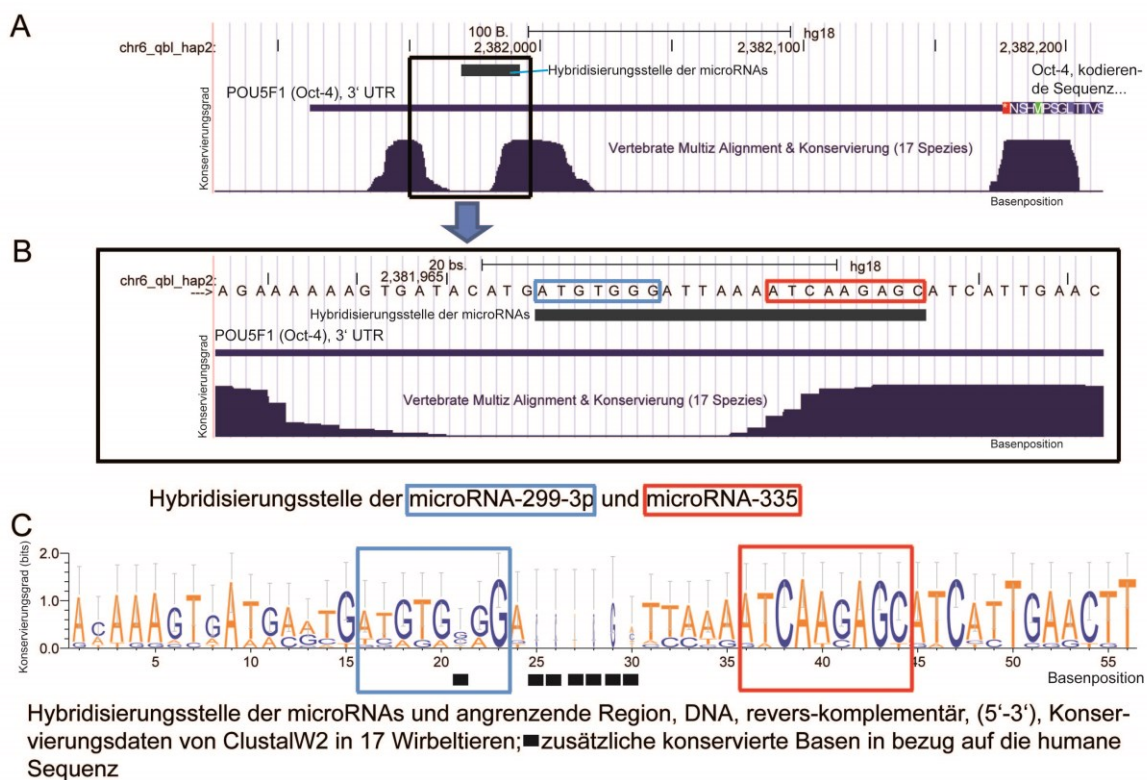
Ausschnitt der Ergebnisse des Hochdurchsatzverfahrens, hier Interaktion von pre-microRNAs mit der 3'UTR von Oct-4. Die Werte stellen den Quotienten Ren/Fly dar. Die Werte der pre-microRNAs-335 und -299-3p sind deutlich an den niedrigen Balken zu erkennen.



**Abbildung 5.9 B Validierte mit den stammzelltypischen Genen wechselwirkende premicroRNAs.**

Rangliste der 20 wirksamsten mit den 3'UTRs der untersuchten Gene interagierende Nukleinsäuren. Die Anordnung nach Rang erfolgte w. o. nach der arithmetischen Mittelung der z-Werte (mit Standardfehlern; die z-Werte sind negativ). Ein sehr niedriger z-Wert korreliert mit hoher Wirksamkeit der jeweiligen RNA. n = 3.

Die Ergebnisse des Dual-Luziferase-Assays wurden mit den bioinformatischen Vorhersagen zur Gen-microRNA-Interaktion des Internetdienstes Targetscan ([www.targetscan.com](http://www.targetscan.com)) verglichen. Für das Gen für Oct-4 konnte die Hybridisierungsstelle der microRNA-335 bei den Basenpaaren 185-192 der 3'UTR-Sequenz ermittelt werden. Die Hybridisierungsstelle der microRNA-299-3p liegt einige Basen dahinter bei den Positionen 200-206 der UTR. Die hybridisierenden Nukleotide wurden mit Hilfe einer Datenbank (Universität von Kalifornien in Santa Cruz, UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>) auf ihre Ähnlichkeit mit den Sequenzen verwandter Arten verglichen. Es zeigte sich, dass die Bindungssequenz für die miR-335 in einem hochkonservierten Bereich liegt; die Sequenz für die miR-299-3p hingegen nur in einem mäßig konservierten Bereich (s. Abb. 5.10). Auf der Basis dieser Sequenzangaben wurden Bindungsanalysen mit mutierten 3'UTR-Sequenzen durchgeführt.



**Abbildung 5.10 Evolutionäre Konservierung der microRNA-Hybridisierungsstellen im Oct-4-Gen in der Analyse des UCSC-Alignment-Programmes (Algorithmus hg18).**

A und B: Grafische Darstellung der miR-Hybridisierungssequenzen als Ausschnitt des Oct-4-Gens auf Chromosom 6 (revers komplementäre Sequenz, für miR-335-5p rot; für miR-299-3p blau). B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus A. Die Höhe der Säulen gibt den Konservierungsgrad des jeweiligen Nukleotides wieder. Verglichen wurden 17 Vertebraten.

B. Beispiele für teilweise oder vollständig konservierte Sequenzen im Genom von 17 Vertebraten (aufgeführt sind Säugerspezies, die tatsächlich Konservierungen aufweisen). Die Höhe des Buchstabens gibt den Konservierungsgrad der jeweiligen Base wieder (Grafik erstellt mit <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Für die microRNA-595 wird vom Programm ebenfalls eine wenig konservierte Hybridisierungsstelle angegeben (Position 257-264 3'UTR).

Für das Gen für Sox-2 wurde keine Übereinstimmung zwischen den luminometrisch festgestellten wirksamen microRNAs und informatisch vorhergesagten Interaktionen gefunden.

Für die auf die Genexpression von Nanog am zweitstärksten wirksame miR-624 wird eine schwach konservierte Hybridisierungsstelle an den Positionen 457-463 von Targetscan vorhergesagt. Ebenso wird für die schwächer wirksame miR-494 eine mäßig konservierte Hybridisierungsstelle an Position 933-939 angegeben.

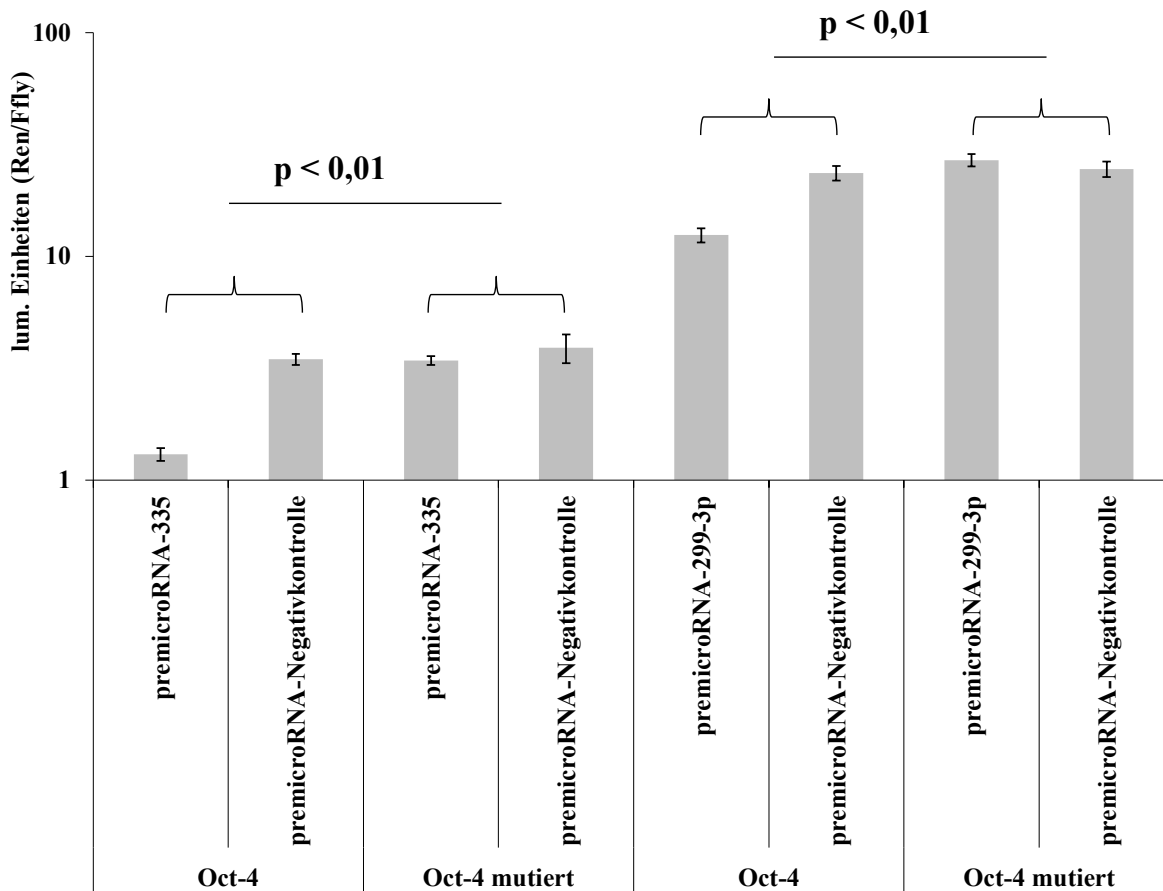
## 5.6 Bindungsanalyse der microRNA-335 und der microRNA-299-3p mit der mRNA von Oct-4

Um zu untersuchen, im welchen Bereich der 3'UTR von Oct-4 die wirksamsten pre-microRNAs-335 und 299-3p binden, wurden zwei pc5/Psi-Vektoren mit einer mutierten 3'UTR kloniert (s. Tab. 5.1) Durch Testverdau wurde die korrekte Sequenz der Vektoren nachgewiesen (s. Anhang, Abb. 8.3).

**Tabelle 5.1** Mutierte Sequenzen in der 3'UTR von Oct-4. Hybridisierungsstelle bioinformatisch ermittelt.

	<b>microRNA-335</b>	<b>microRNA-299-3p</b>
<b>Hybridisierungsstelle (Base-Nr.)</b>	185-191	200-206
<b>Wildtyp-Sequenz</b>	GCTCTTG	CCCACAT
<b>mutierte Sequenz</b>	<i>GGGCGCG</i>	<i>CGGATCC</i>

In mit der mutierten 3'UTR von Oct-4 transient transfizierten Zellen konnte keine Herabregulation des Reporterenzym durch die premiRNAs-335 und -299-3p festgestellt werden; im Gegensatz dazu wurde das Renilla-Signal in den Zellen mit der unveränderten Sequenz der 3'UTR von Oct-4 deutlich verringert (s.Abb. 5.11). Der bioinformatisch vorhergesagte genaue Hybridisierungsstelle der miRNAs-335 und -299-3p konnte damit physiologisch nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.11 Überprüfung der Hybridisierungsanalyse.**

In den mit der unmutierten 3'UTR von Oct-4 transfizierten Zellen sind die microRNAs-335 und -299-3p gegenüber den Kontrollen wirksam; in den mit der jeweils mutierten 3'UTR-Variante transfizierten Zellen ist keine Interaktion der miRNA-335 bzw. -299-3p mehr nachweisbar.

Statistik (mit Standardfehler):  $n = 6$ . p-Wert für Unterschied zwischen miRNA-Spezies: zweifaktorieller nichtparametrischer SRH-Test.

microRNA-335: p-Werte für Unterschiede: miRNA-Spezies:  $p = 0,008$  (im Bild); konzentrationsabhängig:  $p = 0,007$ ; miRNA-Spezies im Vergleich zu Konzentration:  $p = 0,01$ .

microRNA-299-3p: p-Werte für Unterschiede: miRNA-Spezies:  $p = 0,0006$  (im Bild); konzentrationsabhängig:  $p = 0,09$ ; miRNA-Spezies im Vergleich zu Konzentration:  $p = 0,0017$ .

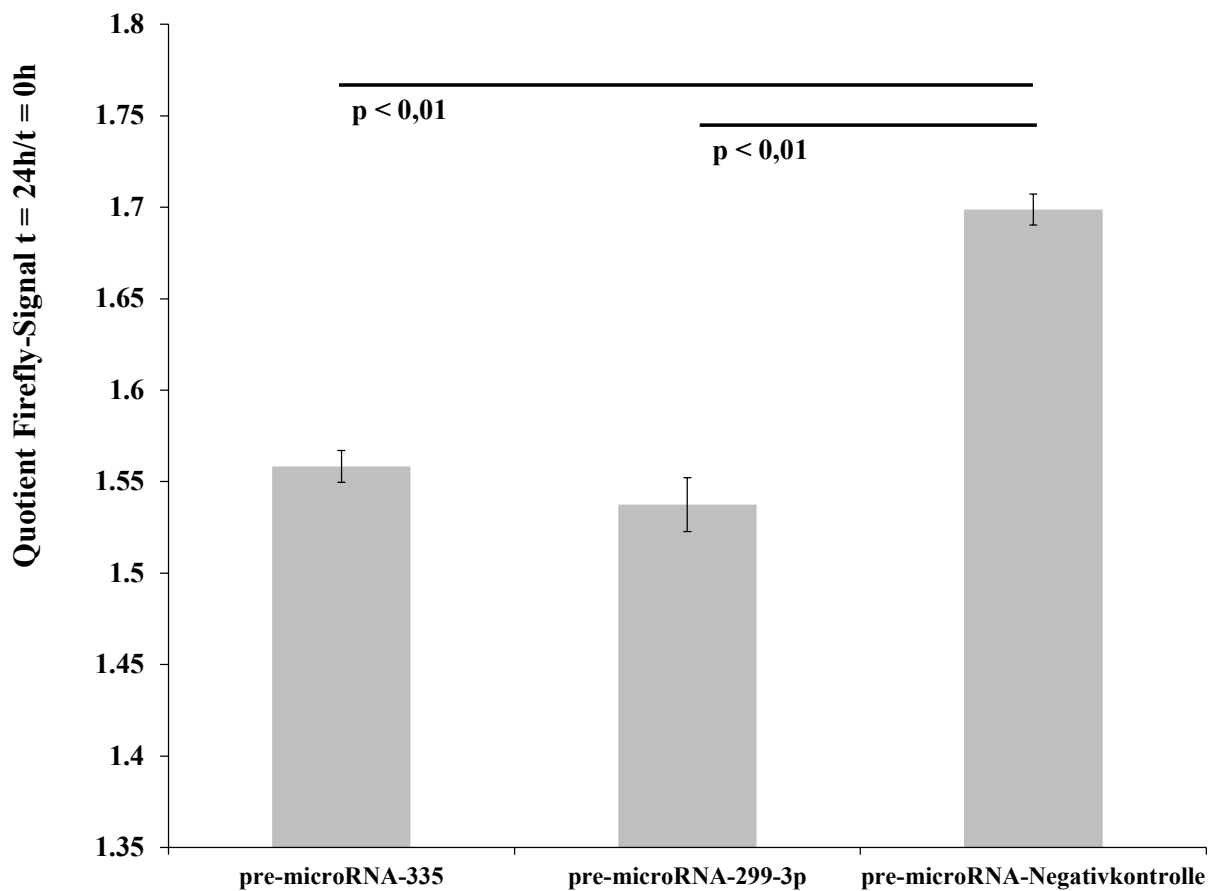
## 5.7 Funktioneller Test wirksamer microRNAs

### 5.7.1 Langzeitmessung für microRNA-Interaktion mit physiologischem Reportersystem

NCC-IT-Oct4-Zellen mit einem integrierten lentiviralen Reportersystem, das eine Verminderung der

nativen Oct-4-Transkription durch ein Abfallen des Signals von Firefly-Luziferase anzeigt, wurden mit den wirksamen pre-microRNAs-335 und -299-3p und als Kontrolle premiR-155 und – Negativkontrolle transfiziert. Die Luziferase-Aktivität in den lebenden Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen im temperierten Luminometer gemessen.

Die Luziferase-Aktivität in dem mit premiRNAs transfizierten Zellen war über die gesamte Messzeit hinweg deutlich geringer als in den Zellen mit den Kontroll-miRNAs (s.Abb. 5.12).



**Abbildung 5.12 Detektion der Interaktion von microRNA-335 und -299-3p im physiologischen Reportersystem.**

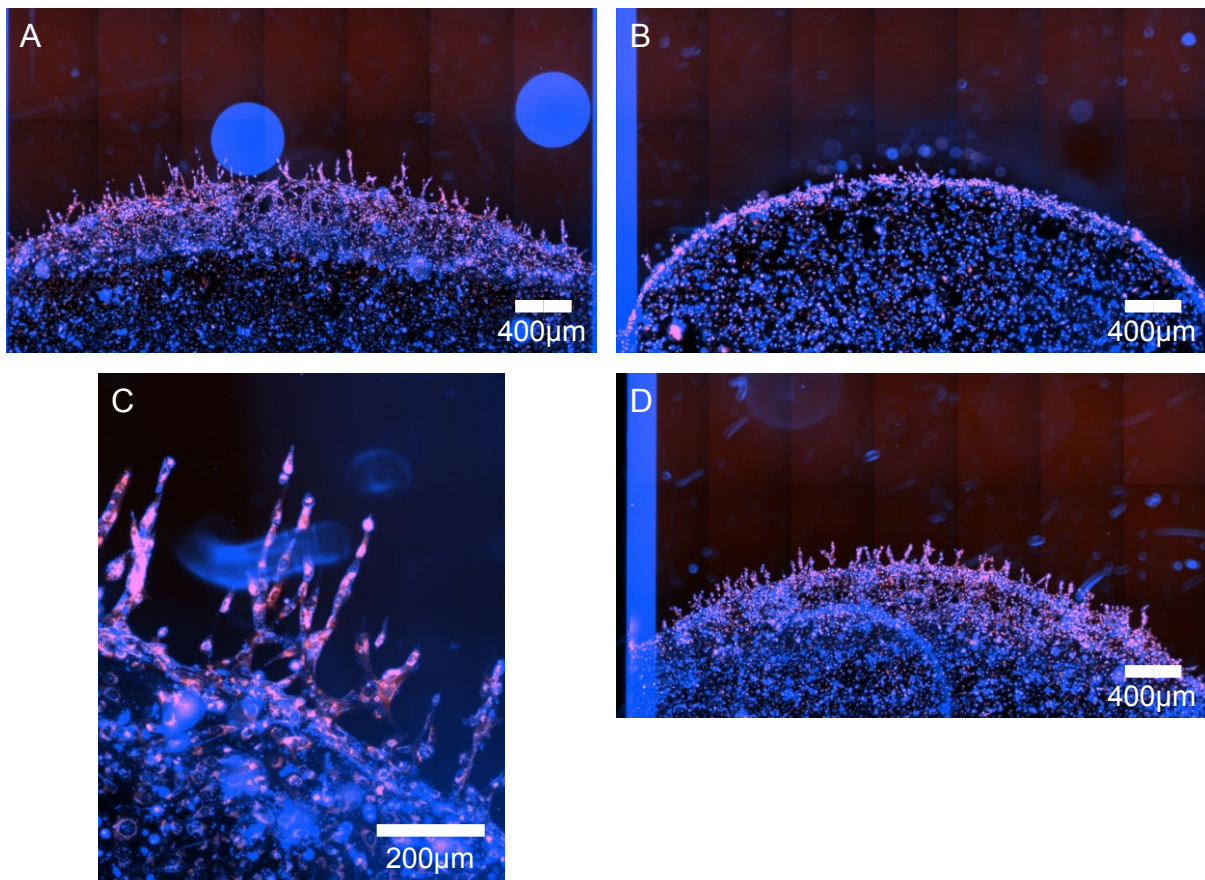
Vermindertes Lumineszenz-Signal in NCC-IT-Zellen mit nativer Oct-4-Expression nach 24h, die mit premiRNA-335 und -299-3p transfiziert wurden, gegenüber Kontrollen. Die Werte wurden als Mittel zu jedem Zeitpunkt aus den Einzelmessungen von Oktuplikaten errechnet.

Statistik (mit Standardfehler): n = 6. Statistische Absicherung: nichtparametrischer H-Test ( $p = 0,0004$ ), Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni, p-Werte im Bild): miRNA-335 im Vergleich zu Negativk.:  $p = 0,008$ ; miRNA-299-3p gg. Negativk.:  $p = 0,001$ . Korrigiertes Bonferroni-Signifikanzniveau: 0,0167.



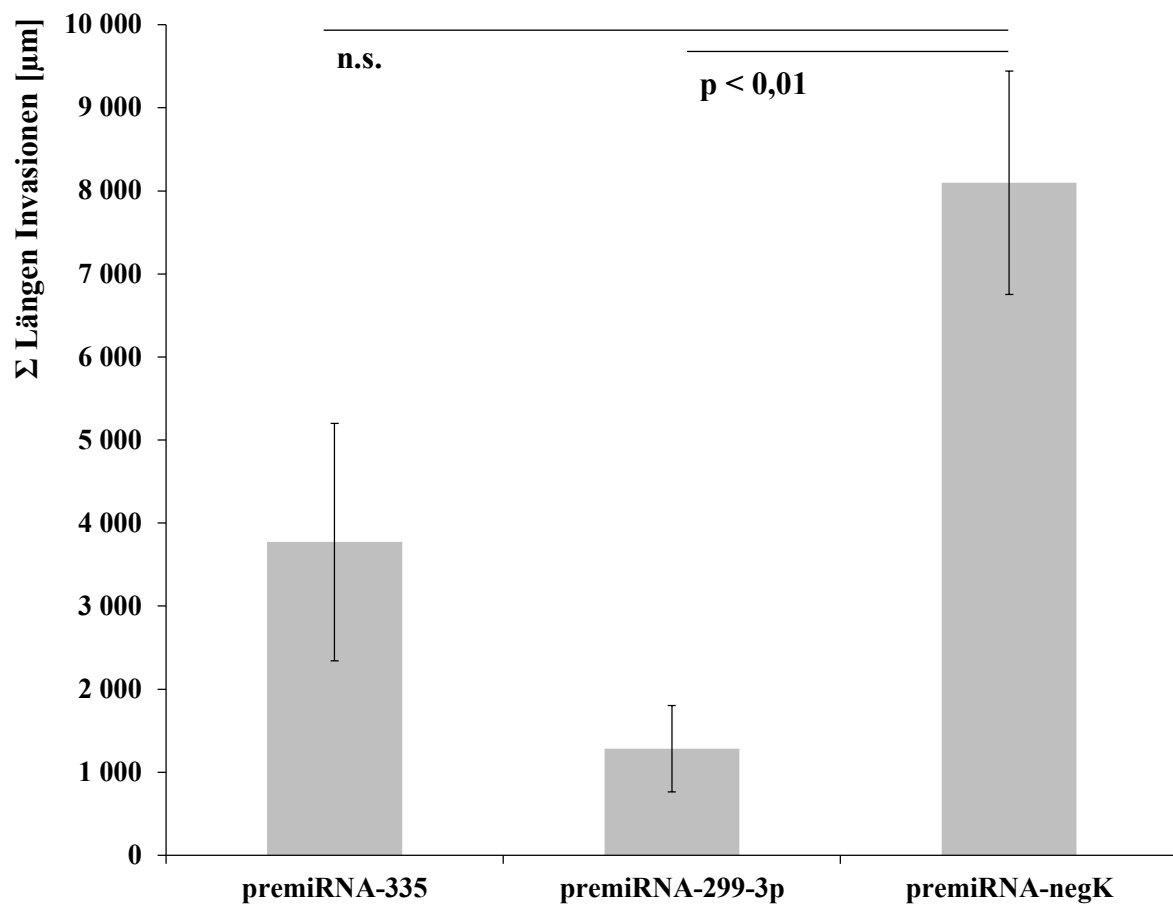
### 5.7.2 Quantitative RT-PCR und Invasionsassay

Um die native Oct-4-Expression in Krebszelllinien zu untersuchen, wurde vergleichend eine halbquantitative RT-PCR mit Gesamt-RNA der Zelllinien MDA-MB-231, NCC-IT-Oct-4 und HEK293 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an die  $\Delta C_T$ -Methode. Die Differenz der Genexpression gemessen mit Hilfe des Schwellenwertzyklus (*Threshold cycle*,  $C_T$ ) wurde als Differenz von  $C_T$  Oct-4 minus PGK-1 errechnet. Je kleiner der Differenzwert, desto höher die Transkriptmenge von Oct-4 gegenüber PGK-1. Dabei zeigte sich, daß die NCC-IT-Oct-4-Zellen weitaus mehr Oct-4-mRNA als die beiden anderen Zelllinien herstellen. Die MDA-MB-231-Zellen exprimierten am wenigsten Oct-4-Transkript; dennoch war es deutlich nachweisbar (s. Anhang, Tab. 9.5). Die Schmelzkurvenanalyse zeigte in jedem technischen Replikate spezifische Amplifikation. Mit premicroRNA-335, -299-3p und –Negativkontrolle transfizierte Brustkrebszellen der Linie MDA-MB-231 wurden in einen Zellkulturchip, in dem sich bereits gefärbtes Matrigel zur Simulation natürlicher Zellmatrix befand, gespritzt und nach 48 Stunden die Grenze zwischen Zellen und Gel mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Für die statistische Auswertung wurden in allen Fotografien bei derselben Vergrößerung die Zahl und die Eindringtiefe der Invasionsereignisse („Kavitäten“) dokumentiert; außerdem wurde ein Verzweigungsindex gebildet. Als statistisches Maß wurden die Summen der Längen der Invasionskavitäten, die Produkte aus mittlerer Eindringtiefe und Kavitätenanzahl jedes Replikates, und für jeden Versuchsansatz (jeweils Triplikate) gemittelt. Der Verzweigungsindex wurde aus dem Produkt der Anzahl der verzweigten Invasionen mit der Zahl der jeweiligen Invasionsspitzen errechnet. Die mit premicroRNA-299-3p transfizierten Zellen verloren ihre Invasivität nahezu vollständig; wohingegen die mit der premicroRNA-335 transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle ein nur vermindertes, statistisch nicht signifikantes Invasionsverhalten zeigte (s. Abb. 5.13 – 5.16).



**Abbildung 5.13 Invasionsassay: invadierende Brustkrebszellen nach Stimulation mit microRNAs.**

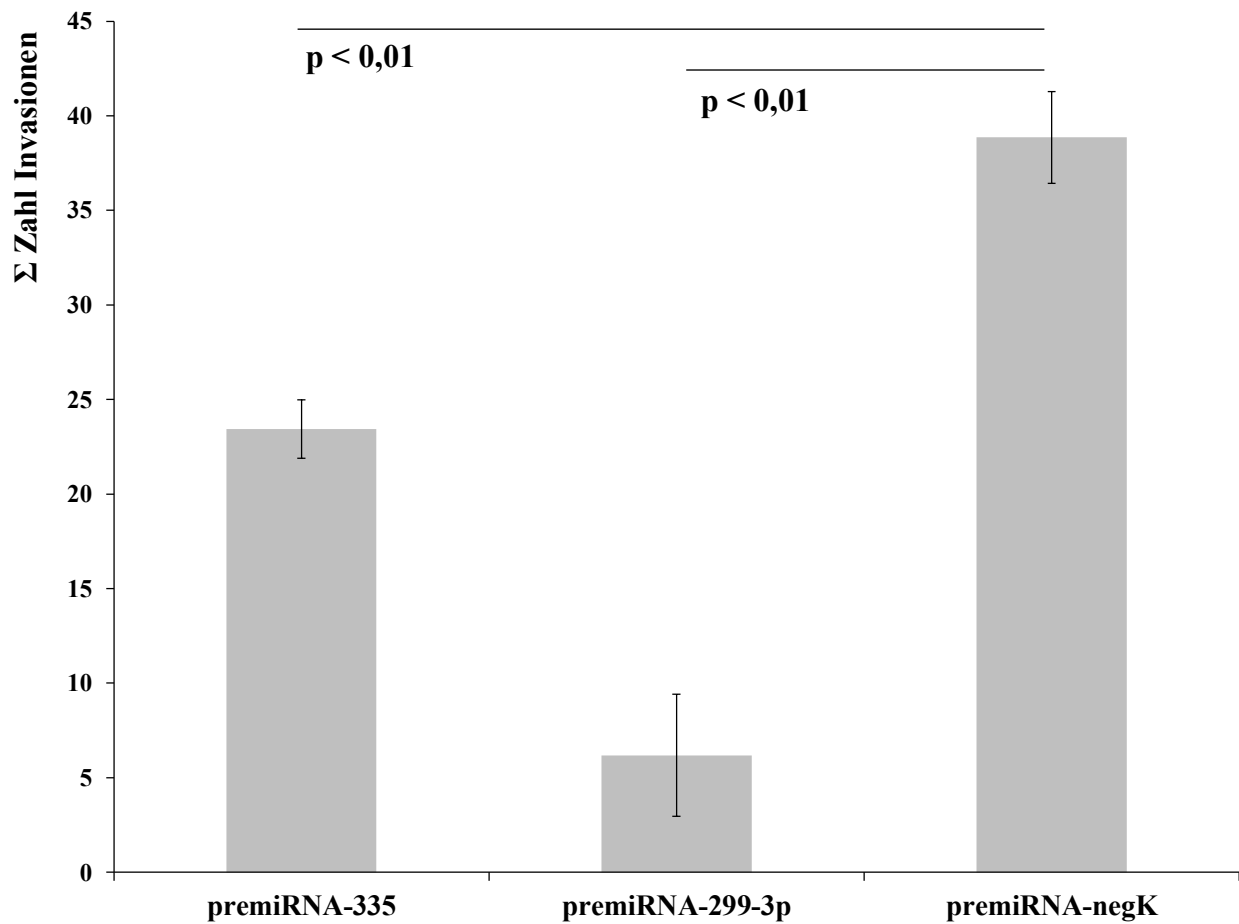
MDA-MB-231-Zellen, transfiziert mit pre-microRNA-Negativkontrolle (A, vergrößerter Ausschnitt C), -299-3p (B), und -335 (D). Die Zellen mit pre-microRNA-299-3p und -335 zeigen ein extrem bzw. moderat verringertes Invasionsverhalten im Vergleich zur Kontrolle. Objektiv: 10x /A,B,D; 40x/ C. Hinweis: Die blauen Streifen und Kreise im Bild sind von der Auswertungssoftware hervorgerufene Artefakte und sind wissenschaftlich ohne Bewandnis.



**Abbildung 5.14 Invasionsassay: Summen der Längen der Invasionsereignisse in µm.**

Statistik (mit Standardfehler): n = 9/10/7 (miR-335, miR-299-3p, miR-negK). Die premicroRNA-299-3p unterbindet die Invasion der Krebszellen deutlich.

Statistische Absicherung: nichtparametrischer H-Test ( $p = 0,0004$ ), Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni, p-Werte im Bild): miRNA-335 im Vergleich zu Negativk.:  $p = 0,1115$  (nicht signifikant, n.s.); miRNA-299-3p gg. Negativk.:  $p = 0,0001$ . Korrigiertes Bonferroni-Signifikanzniveau: 0,0167.

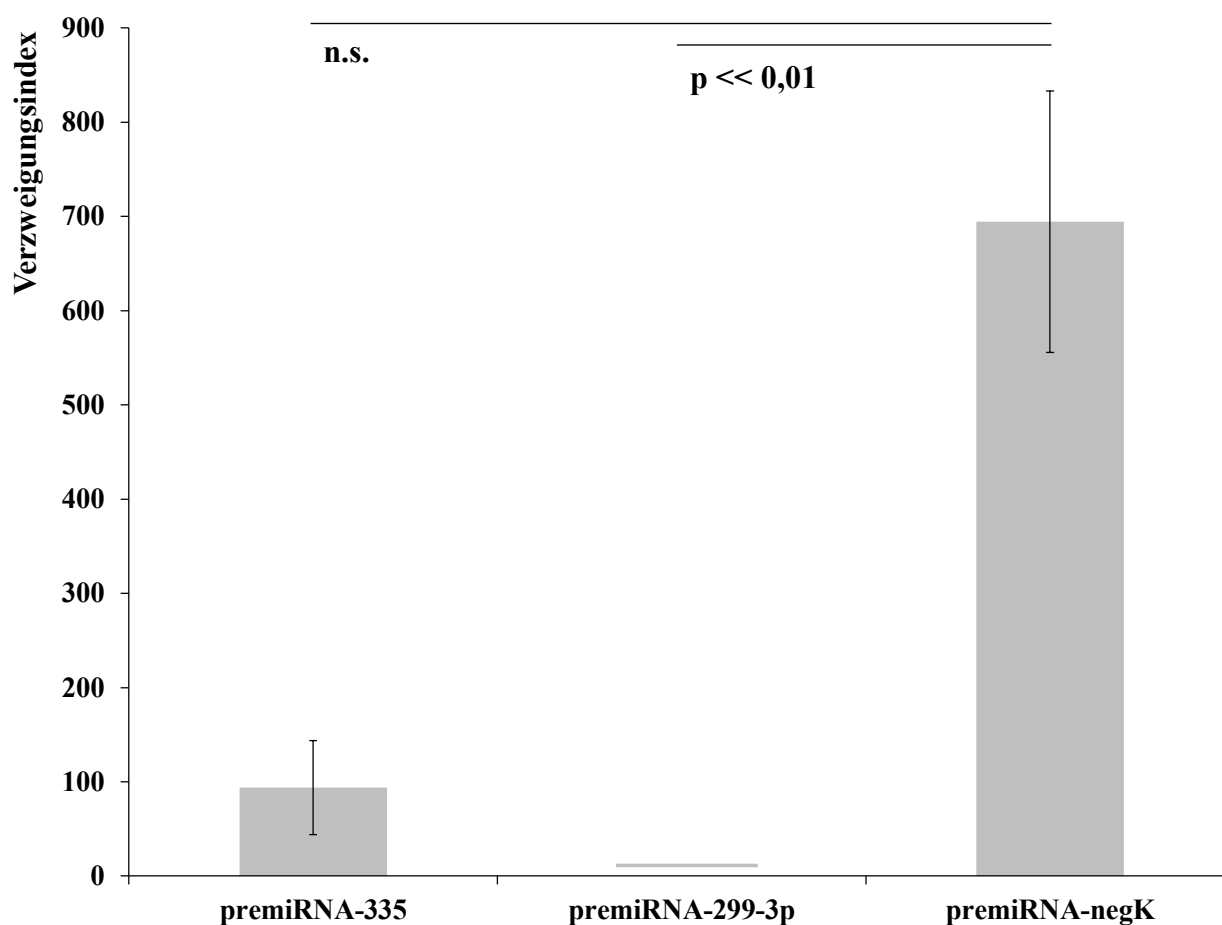


**Abbildung 5.15 Invasionsassay: Zahl der Invasionsereignisse.**

Die Zahlen der Invasionskavitäten wurden arithmetisch gemittelt. Die premicroRNA-299-3p unterbindet die Invasion der Krebszellen deutlich.

Statistik (mit Standardfehler):  $n = 9/10/7$  (miR-335, miR-299-3p, miR-negK).

Statistische Absicherung: nichtparametrischer H-Test ( $p = 0,0013$ ), Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni, p-Werte im Bild): miRNA-335 im Vergleich zu Negativk.:  $p = 0,0041$ ; miRNA-299-3p gg. Negativk.:  $p = 0,0001$ . Korrigiertes Bonferroni-Signifikanzniveau: 0,0167.



**Abbildung 5.16 Invasionsassay: Verzweigungsstatistik der Invasionsereignisse.**

Die Zahl der Verzweigungsspitzen wurde mit der Summe aller verzweigten Invasionskavitäten multipliziert, um einen Verzweigungsindex zu errechnen. Die mit premicroRNA-299-3p transfizierten Zellen zeigten keinerlei Verzweigungen. Sie unterbindet die Invasion der Krebszellen deutlich.

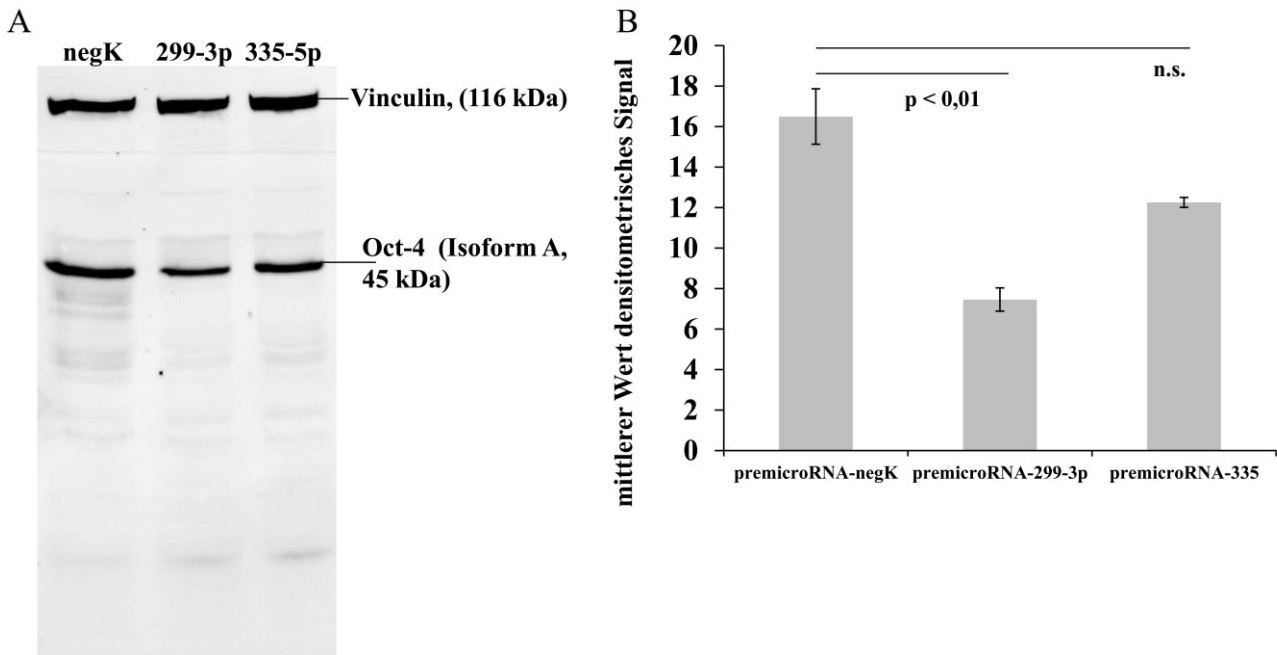
Statistik (mit Standardfehler  $n = 9/10/7$  (miR-335, miR-299-3p, miR-negK)). Statistische Absicherung: nichtparametrischer H-Test ( $p \ll 0,01$ ). Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni, p-Werte im Bild): miRNA-335 im Vergleich zu Negativk.:  $p = 0,0385$  (nicht signifikant, n.s.); miRNA-299-3p gg. Negativk.:  $p \ll 0,01$ . Korrigiertes Bonferroni-Signifikanzniveau: 0,0167.

### 5.7.3 Proteinblot

Im Western Blot konnte die Isoform A des Oct-4-Proteins in NCC-IT-Oct4-Zellen nachgewiesen werden. Zur Normalisierung der erhaltenen densitometrischen Ergebnisse wurden die Werte der Ladekontrolle (Vinculin) miteinander verglichen. Der höchste Wert wurde gleich 100% gesetzt und die Werte der anderen Proben entsprechend angepaßt.

Die densitometrischen Messungen zum Oct-4-Protein (Isoform A) wurden entsprechend der Anpassungen der Ladekontrolle umgerechnet und verglichen. Analog zu den Ergebnissen der luminometrischen Messungen und Invasions-Untersuchungen ergab sich eine deutliche und

signifikante Verringerung der Oct-4-Synthese in NCC-IT-Oct4-Zellen, welche mit premicroRNA-299-3p transfiziert wurden (s. Abb. 5.17 und 5.18).



**Abbildung 5.17 Proteinblot: Detektion des Transkriptionsfaktors Oct-4 in mit microRNA-335, -299-3p und -Negativkontrolle transfizierten NCC-IT-Oct4-Zellen.**

A. Infrarotdetektion des Vinculin- und Oct-4-Isoform A-Signals. Gezeigt ist hier ein Membranausschnitt von einem der beiden durchgeführten Experimente. Die Bande des Oct-4-Protein-Signals, Isoform A, ist in den Lysaten der mit premiR-299-3p stimulierten Zellen schwächer ausgeprägt.

B. Densitometrische Auswertung: Die microRNA-299-3p reguliert die Expression des Oct4-Proteins signifikant herunter. Statistik (mit Standardfehler): n = 4/4/4 (miR-negK, miR-299-3p, miR-335). Statistische Absicherung: nichtparametrischer H-Test (p = 0,0154), Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni, p-Werte im Bild): miRNA-335 im Vergleich zu Negativk.: p = 0,0624 (nicht signifikant, n.s.); miRNA-299-3p gg. Negativk.: p = 0,0044; korrigiertes Bonferroni-Signifikanzniveau: 0,0167.

## 6. Diskussion

### 6.1 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die regulatorische Wechselwirkung zwischen humanen microRNAs und Transkripten von stammzelltypischen Transkriptionsfaktorgenen (Oct-4, Sox-2, lin-28) mittels Hochdurchsatzverfahren untersucht werden. Die gefundenen auf Oct-4 wirksamen microRNA-Spezies miR-335 und miR-299-3p wurden anschließend in physiologischen zellulären Assays genauer betrachtet.

Dabei zeigte sich eine deutliche Minderung des invasiven Verhaltens der untersuchten Krebszellen und eine deutlich verminderte natürliche Oct-4-Expression in diesen Zellen.

#### 6.1.1 Oct-4, Sox-2 und Nanog reprimierende microRNAs

Mit Hilfe des luminometrischen Reporterassays im Hochdurchsatz konnten einige humane microRNAs ermittelt werden, die die Genexpression von Oct-4, Nanog und Sox-2 wirksam reprimieren. Die microRNA-335 und -299-3p, die die Transkription des zentralen Stammzellgens Oct-4 regulieren, stachen besonders hervor und wurden daher in den weiteren Untersuchungen näher betrachtet. Die Verminderung der Oct-4-Expression durch die Transfektion mit den microRNAs-335 bzw. -299-3p konnte unterstützend auch im Proteinblot nachgewiesen werden. Eine Bindungsanalyse mit mutierter 3'UTR von Oct-4 konnte zeigen, welche Nukleotide der 3'UTR mit den beiden microRNAs hybridisieren. Im Datenbank-Vergleich (UCSC genome browser) der humanen 3'UTR-Sequenz von Oct-4 mit den Sequenzen nah verwandter Arten, wie dem Schimpansen, zeigte sich, daß die Hybridisierungsstelle der miR-335 in einem hochkonservierten Bereich liegt; die Stelle der miR-299-3p hingegen in einem weniger konservierten Bereich. Daraus läßt sich schließen, daß die miR-335 in der Stammesentwicklung von Primaten, aber auch Nagetieren bereits längere Zeit als regulativer Faktor für das Oct-4-Gen fungiert. Die miR-299-3p hingegen scheint erst auf der Ebene der Menschenaffen ihre Funktion als Repressor der Oct-4-Expression gewonnen zu haben.

Zur zusätzlichen Validierung der Ergebnisse des Hochdurchsatzverfahrens wurden die Daten zu einzelnen microRNAs mit aktuellen Literaturangaben verglichen.

Die auf das Gen **Oct-4** stark reprimierend wirkende microRNA-335 wurde bereits im Mausmodell im Zusammenhang mit diesem Stammzellgen und pRB in einer Publikation aufgeführt (Schoeftner

et al., 2013). Die microRNA-335 ist als ein wichtiger Regulator für das Schicksal von Stammzellen, insbesondere für die Differenzierung, bekannt (Tomé et al., 2011).

Die im Rahmen dieser Dissertation detektierte auf Oct-4 ebenfalls wirksame miRNA-299-3p fand bislang in den Datenbanken (Pubmed) in Bezug auf Stammzellgene noch keine Erwähnung. Allerdings berichtet eine Forschungsarbeit über die Hochregulation dieser miRNA-Spezies in seneszenten HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) (Jong et al., 2013), was die Blockade der Oct-4-Expression und damit die Erneuerungsfähigkeit der Endothelzellen bewirken könnte. Außerdem blockiert die miR-299-3p die Expression des Androgenrezeptors (AP) in Prostatakarzinomzellen (Östling et al., 2011).

Die ebenfalls Oct-4 reprimierende microRNA-301 wird in der Literatur als Onkomir in Bezug auf Brustkrebs beschrieben (Shi et al., 2011).

Auch die im Rahmen dieser Forschungsarbeit auf die Expression von **Sox-2** reprimierend wirkenden detektierten microRNAs wurden von anderen Arbeitsgruppen teilweise bereits beschrieben. So bindet die miRNA-126 in unterschiedlichen Zelllinien an zwei verschiedenen Stellen der 3'UTR des Sox-2-Transkriptes und trägt so zur Karzinogenese von Magentumoren bei (Otsubo et al., 2011). In anderen Quellen wird diese microRNA-Spezies als tumorsupprimierend via Blockade der Genexpression von Sox-2, VEGF oder HOX-A9 beschrieben (Ebrahimi et al., 2014). Die microRNA-629 bindet an die 3'UTR des Transkriptes von NBS-1 (*Nijmegen breakage syndrome*), ein Gen, das in die DNA-Reparatur-Maschinerie der Zelle eingebunden ist (Yang et al., 2012). Die Expression einer Form von miRNA-450, 450-b-5p, wird von TGF- $\beta$ 1 unterdrückt und bewirkt so die Blockade der myogenischen Differenzierung von Muskeltumoren (Sun et al., 2013). Eine andere Form der miR-450, miR-450a-3p, reguliert die Entwicklung von Mäuse-Embryonen über die Supprimierung des Transkriptes von Bub-1 (*budding uninhibited by benzimidazoles 1*, eine Serin/Threonin-Protein-Kinase) (Luo et al., 2012). Die microRNA-636 wurde als Tumorsuppressor in Leberkrebszellen beschrieben, der über die Herabregulation von Ras (*Rat sarcoma*) wirkt (Jang et al., 2013). Die microRNA-515-5p wurde als Tumorsuppressor in Mammakarzinomzellen identifiziert und wird von dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  reprimiert (Pinho et al., 2013). Diese microRNA unterdrückt die Expression des Interleukin-1-Rezeptors und steht damit im Zusammenhang mit BRCA-1 (BRCA1, early-onset) - abhängigen Brustkrebserkrankungen (Gilam et al., 2013).

Die auf die Expression von **Nanog** reprimierend wirkenden detektierten microRNAs wurden in der wissenschaftlichen Literatur bislang kaum charakterisiert. Nur die im Zusammenhang mit der Sox-



2-Supprimierung oben bereits erwähnte microRNA-126 und die microRNA-let7a werden in einigen Publikationen beschrieben. So ist die miR-126 an der Differenzierung von Embryonalen Stammzellen zu Endothelien im Mausmodell mitverantwortlich. Die Expression der evolutionär hochkonservierten und für Entwicklungsprozesse mehrerer Tierstämme äußerst wichtige miR-let7a ist in Kopf-Hals-Karzinomzellen herunterreguliert (Pasquinelli et al., 2000), wohingegen Oct-4 und Nanog heraufreguliert sind (Yu et al., 2011).

Die Ergebnisse zur Bestimmung der auf stammzelltypische Gene wirksame microRNAs mithilfe des luminometrischen Hochdurchsatzverfahrens decken sich zu einem Teil mit vorhergesagten Interaktionen unterschiedlicher bioinformatischer Programme wie Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) beispielsweise bezüglich Oct-4 und der microRNAs miR-335 und -595. Einige experimentell nachgewiesene deutliche Wechselwirkungen wie die zwischen der miR-573 und Oct-4 oder miR-126 und Sox-2 hingegen konnten theoretisch nicht ermittelt werden. Zudem führt die Literatur mehrere sehr wichtige microRNA-Zielgen-Zusammenhänge auf, die im Hochdurchsatzexperiment der vorliegenden Forschungsarbeit nicht detektiert wurden. So existiert wie in der Einleitung erwähnt eine große Zahl von Referenzen zur Regulation von Oct-4 und Sox-2 durch die microRNA-145 (Xu et al., 2009; Hu et al., 2012b), die in der Analyse dieser Arbeit nicht unter den 20 wirksamsten RNA-Molekülen zu finden ist. Dasselbe Phänomen konnte bei der Wechselwirkung von Nanog und miR-214 festgestellt werden (Yang et al., 2008; Xu et al., 2012a). Ein Grund für diese mangelnden Übereinstimmungen könnte die in der vorliegenden Arbeit genutzte Zelllinie HEK293-Flp-In sein, deren RNA-verarbeitende Maschinerie nicht völlig kongruente Produkte liefert wie die Enzyme in den von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Zellen. Weiterhin kann vermutet werden, dass das hier genutzte Reporter-gen-Hochdurchsatzverfahren möglicherweise einzelne falsch negative Ergebnisse liefert. Darüberhinaus ist anzunehmen, daß die Algorithmen von bioinformatischen Interaktions-Detektionsprogrammen wahrscheinlich aufgrund heuristischer Sparsamkeitsprinzipien recht eng gefaßte Parameter enthalten und so nicht die gesamte Vielfalt der natürlichen chemischen und biochemischen Wechselwirkungen erfassen können.

### **6.1.2 Stammzellgene und Tumorzellen**

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde untersucht, ob das Oct-4-Gen blockierende microRNA-Moleküle geeignet sein könnten, um maligne Zellen an der Invasion zu hindern bzw. Apoptose in ihnen zu induzieren.

Wie in der Einleitung angedeutet, stellen Krebszellen in Säugetieren nach einer aktuellen Theorie von Robert Weinberg und anderen gewissermaßen das Verhalten von Embryonen nach, die aktiv in „parasitärer“ Weise in die Gebärmutter Schleimhaut invadieren und Blutgefäße zur eigenen Versorgung anlocken (Mani et al., 2008). Malignität erscheint daher wie die Auswirkung teilweise wiedergewonnenen embryonalen Stammzellcharakters von längst ausdifferenzierten somatischen Zellen oder adulten Stammzellen (Kalluri und Weinberg, 2009; Polyak und Weinberg, 2009). Daher kann vermutet werden, dass Gene wie Oct-4, Sox-2 oder Nanog in Zellen solider Tumoren exprimiert werden und bei der Entstehung von Krebs, wie beim Verlauf der Krankheit, eine erhebliche Rolle spielen. Tatsächlich wurde in der Literatur über die Aktivierung von Oct-4 in Krebszellen der Harnblase (Chang et al., 2008), des Magens (Huang et al., 2012), der Leber (Yin et al., 2013), des Dickdarms (Lin et al., 2012) und des Rektums berichtet (Dai et al., 2013). Bei Speiseröhrenkrebs bzw. oralen Karzinomen könnte die Expression von Oct-4 als Marker für die Überlebensprognose dienen (He et al., 2012; Siu et al., 2012). Es gibt allerdings auch Berichte zur Nichtexpression von Oct-4 in bestimmten somatischen Krebszellpopulationen (Mueller et al., 2009). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Malignität infolge Anschaltung von Stammzellgenen entweder nur eine Möglichkeit der Krebsinitiation ist, oder dass Gene stromabwärts in der Signalkaskade von Oct-4 aktiviert wurden und daher das Transkriptionsfaktorgen nicht mehr exprimiert werden muß, um das invasive Verhalten der Zellen aufrecht zu erhalten.

### **6.1.3 Die microRNAs-335 und -299-3p als Onkomir und Tumorsuppressor**

Die eingangs in der Diskussion zitierten Forschungsarbeiten zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Expression von auf Stammzellgene wirksamen microRNAs und Krebserkrankungen.

In der vorliegenden Dissertation wurde daher untersucht, ob das Gen des Transkriptionsfaktors Oct-4 blockierende microRNA geeignet sein könnte, um maligne Zellen an der Invasion zu hindern bzw. Apoptose in ihnen zu induzieren.

In vielen weiteren Artikeln wird auf die Bedeutung von microRNAs für Krebserkrankungen (Lee und Dutta, 2009) hingewiesen, zum Beispiel bei der Metastasierung von Karzinomzellen (Nicoloso et al., 2009) und bei der Unterscheidung von induzierten pluripotenten und Krebsstammzellen (Gunaratne, 2009).

Die humane microRNA-145 wurde bereits als proliferations- und invasionshemmend für

Endometriose-Zellen beschrieben, in denen unter anderem Oct-4 herabreguliert wurde (Adammek et al., 2013). Die microRNA-128 wurde als proliferations- und selbsterneuerungs-inhibierend bei Gliomen charakterisiert (Godlewski et al., 2008).

Die microRNA-335, die in dieser Dissertation als die Expression von Oct-4 herabregulierend identifiziert wurde, orchestriert Proliferation, Migration und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen des Menschen (Tomé et al., 2011) und wurde in verschiedenen Tumorarten als wichtiger Regulator erkannt. So ist die microRNA-335-Expression in adrenokortikalen Karzinomen (Schmitz et al., 2011) und Osteosarkomen (Hu et al., 2012a) herunterreguliert und inhibiert das Wachstum und die Invasion maligner Astrozytomzellen (Shu et al., 2011). Sie unterdrückt weiterhin die Metastasierung von Magenkrebszellen (Xu et al., 2012b) und Mammakarzinomen (Tavazoie et al., 2008; Zhang et al., 2012); außerdem erhöht sie die Apoptoserate in Brustkrebszellen (Heyn et al., 2011). Die microRNA-335 verhindert die Tumor-Reinitiation von Brustkrebszellen und ist in aktiven Mammakarzinomen herabreguliert (Png et al., 2011; Hu et al., 2012a; Yasui, 2012).

Allerdings gibt es auch Veröffentlichungen, die berichten, daß die microRNA-335 in humanen benignen und malignen Tumorzellen hochreguliert ist und daher teils als prognostischer Faktor für das Wiederauftreten des Tumors und das Überleben der Patienten dienen kann (Jiang et al., 2012; Shi et al., 2012). Dieser paradoxe Befund könnte damit erklärt werden, daß möglicherweise die microRNA-335 ein natürliches Anti-OncomiR der Zelle darstellt und im Falle einer Entartung exprimiert wird. Damit im Zusammenhang steht die Beobachtung, daß diese microRNA die Differenzierung von Gliomen (Shu et al., 2012) bewirkt und die Invasivität von Neuroblastomen unterdrückt (Lynch et al., 2012).

Hochinteressant ist die Beobachtung, dass die microRNA-335 in Eierstockkrebszellen, die gegen Chemotherapeutika resistent sind, herabreguliert ist, was mit der Expression von Oct-4 einhergehen könnte (Sorrentino et al., 2008). In Mammakarzinomen wurde eine teils deutlich unterschiedliche Expression von microRNAs, darunter miR-335, festgestellt (Raychaudhuri et al., 2012). Da stammzellähnliche Krebszellpopulationen durch Medikamente häufig deutlich schlechter angesprochen werden können als terminale Zellen (Domingo-Domenech et al., 2012; Abdullah und Chow, 2013; Vidal et al., 2013), würde sich eine (micro)RNA-basierte Therapie als mögliche Alternative oder Ergänzung anbieten.

Die genetische Kopiervorlage für die microRNA-335 liegt im menschlichen Genom in einem Intron

von MEST (*Mesoderm-specific transcript homolog protein* oder *Paternally expressed gene 1, PEG-1*) (Dohi et al., 2013) und wird in Leberkrebszellen epigenetisch durch Hypermethylierung gemeinsam mit dem Proteingen abgeschaltet. Dieses Phänomen lässt Krebserkrankungen weniger als eine zufällige und unregulierte zelluläre Entartung erscheinen, sondern als einen erstaunlich fein gesteuerten Prozeß auf allen Ebenen der Genexpression, was die neue Theorie zum stammzellähnlichen Verhalten maligner Tumorzellen (s.o.) unterstützt (Ben-Porath et al., 2008; Kim und Orkin, 2011).

Die microRNA-299-3p, über die im Zusammenhang mit Stammzellgenen gegenwärtig keine Daten in der Literatur verfügbar sind, wird in einer Publikation in malignen Mesotheliomzellen als differentiell exprimiert identifiziert (rauchende im Vergleich zu nicht rauchenden Spendern) (Guled et al., 2009); in einer anderen wird sie als wichtiger Faktor der replikativen Seneszenz in HUVECS (*human umbilical vein endothelial cells*) beschrieben (Jong et al., 2013). Im Vergleich zum murinen microRNA-Expressionsmuster ist die microRNA-299-3p in humanen iPSen und nativen Stammzellen heraufreguliert (Razak et al., 2013).

Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass microRNA ein geeignetes Molekül sein könnte, maligne Tumorzellen durch Blockierung ihrer potentiellen Unsterblichkeit, ihrer Metastasierungs- und ihrer Invasionsfähigkeit zu bekämpfen. Im Mausmodell wurde diese Strategie bereits mit Hilfe therapeutischer RNA erfolgreich angewandt (Kota et al., 2009). Eine ähnliche Strategie besteht darin, komplementäre Nukleinsäuren („AntagomiR“) einzusetzen, die eine perfekte Sequenzspezifität zur Ziel-miRNA aufweisen und so mit der mRNA, an die die microRNA bindet, konkurriert (Krützfeldt et al., 2005; Czech, 2006). Auf diese Weise könnten protoonkogenische microRNAs („OncomiR“) stillgelegt werden (Medina et al., 2010).

Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation die humanen Anti-Oct-4-microRNAs-335 und -299-3p in Invasionsexperimenten eingesetzt, um zu überprüfen, ob Mammakarzinomzellen der Linie MDA-MB-231 an der Zersetzung von Hydrogel, das die natürliche Zellmatrix simuliert, gehindert werden können. Es wurde bereits über die Herabsetzung der Invasionsfähigkeit von Kolonkarzinom- und Blasenkrebszellen mit konstitutiv blockierter Oct-4-Expression berichtet (Chang et al., 2008; Dai et al., 2013). Die Überexpression von Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche die enzymatische Zersetzung von Matrix und damit die Invasion ermöglichen, wurde in Krebszellen nachgewiesen (Zucker und Vacirca, 2004; Langers et al., 2008; Boström et al., 2011).

Zumindest im Falle der Oct-4-Blockade durch miR-299-3p konnte in dieser Arbeit eine deutliche Verminderung der Invasionsfähigkeit untersuchter Krebszellen erreicht werden.

#### 6.1.4 Stammzelltypische microRNAs, native und induzierte Stammzellen

Da maligne Veränderungen von Körperzellen zumeist mit einer Dedifferenzierung einhergehen (Friedmann-Morvinski und Verma, 2014; Tanaka et al., 2014), ist anzunehmen, daß als tumorsupprimierend erkannte microRNAs auch in der Lage sein könnten, in natürlichen oder induzierten Stammzellen eine Differenzierung einzuleiten. Auf diese Weise könnten miRNAs beispielsweise dazu genutzt werden, embryonale und keimblattspezifische Stammzellen oder iPS in funktionale gewebstypische Zellen zu transformieren. Solche ausdifferenzierten Zellen könnten bei der autologen Geweberegeneration in Zukunft eine wichtige Rolle spielen, da sie nicht transgen sind und somit ein geringeres Risiko der malignen Entartung besitzen. Die Charakterisierung von tumorsupprimierenden und anderen die Zelldifferenzierung einleitenden microRNAs kann daher ein für die Stammzelltechnologie wichtiges Forschungsfeld darstellen.

Die wissenschaftliche Literatur nennt in diesem Zusammenhang vor allem microRNA-Spezies, die für die Differenzierung in Zellen des Bewegungsapparates und des Nervensystems Bedeutung haben. Allerdings werden auch einige evolutionär konservierte Moleküle aufgeführt, die allgemein für die Regulation des Selbsterneuerungsstatus bedeutsam sind.

In skelettalen humanen Stammzellen embryonaler Herkunft konnte beispielsweise die microRNA-146a als Marker für differenzierende Zellen in der Diaphyse gegenüber anderen Zellpopulationen der Epiphyse identifiziert werden (Cheung et al., 2014). Die microRNAs-145 und -let7g erscheinen als feinregulierende Faktoren für die Einleitung der Differenzierung im Gegensatz zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Status in mesenchymalen adulten Stammzellen (Adegani et al., 2013). In humanen mesenchymalen Stammzellen synovialer Herkunft konnte durch Transfektion von microRNA-23b die Einleitung der chondrogenen Differenzierung erreicht werden (Ham et al., 2014).

Neben Differenzierungsmarkern für Stammzellen mesodermaler Herkunft sind außerdem eine Reihe von microRNAs für die humane und murine neuronale Entwicklungslinie charakterisiert worden. So reguliert die miR-124 über Blockierung der Expression eines epigenetisch bedeutsamen Enzyms (Ezh2) die Differenzierung in Neuronen oder Astrozyten (Neo et al., 2014). Die microRNA-34a unterstützt die Differenzierung von induzierten Stammzellen (iPS) der Maus zu neuronalen Stammzellen durch Inhibierung von Sirtuin 1, einem Enzym der zellulären Signaltransduktion (Hu et al., 2014). Die microRNA-29a moduliert die neuronale Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen der Ratte durch Wechselwirkung mit dem Protein REST (*RE-1 silencing transcription factor*) (Duan et al., 2014). Der für die neuroektodermale Entwicklung

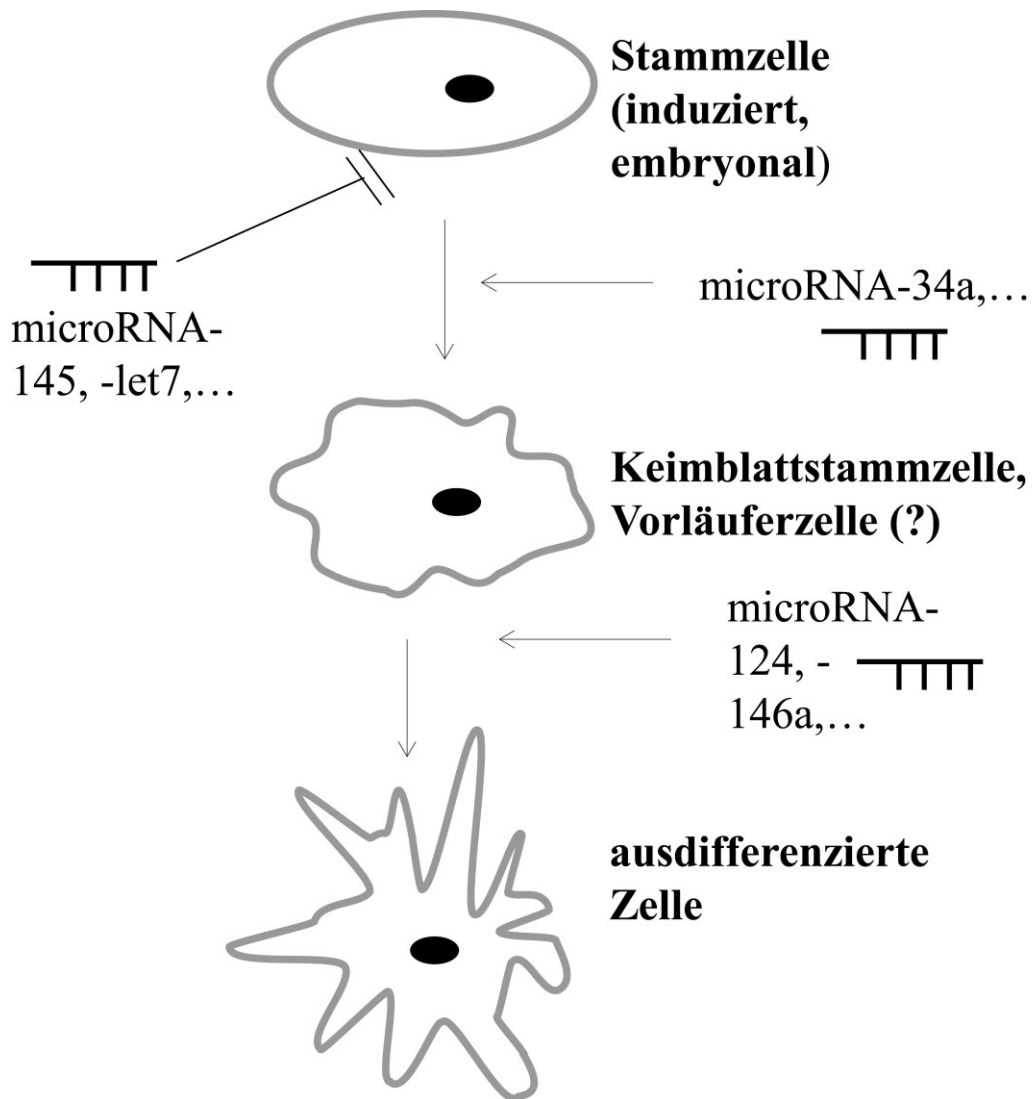
wichtige Transkriptionsfaktor Pax-6 (*Paired box protein-6*) aktiviert in humanen embryonalen Stammzellen die Expression der microRNA-135b, die über Blockierung des TGF- $\beta$ /BMP-Signalweges die neuronale Differenzierung der Zelle vorantreibt (Bhinge et al., 2014).

Die hochkonservierte miR-200-microRNA-Familie besitzt eine wichtige regulatorische Funktion bei der Neurogenese sowohl in Wirbeltieren wie in wirbellosen Organismen (Peng et al., 2012; Trümbach und Prakash, 2014). Ein Mitglied dieser Familie, miR-200a, wurde auch in dieser Arbeit als reprimierender Faktor des Stammzellgenes Nanog identifiziert.

Zu den den Selbsterneuerungsstatus einer Stammzelle regulierenden Molekülen gehört die evolutionär sehr stark konservierte let7-microRNA-Familie. Deren Mitglieder wechselwirken teils mit dem Transkriptionsfaktor lin-28 und bewirken so allgemein die Transformation einer Stamm- in eine differenzierende Zelle (Melton et al., 2010; Rehfeld et al., 2014). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurden die microRNAs-let 7a und b in dieser Arbeit als reprimierend für alle drei untersuchten stammzelltypischen Gene identifiziert (Oct-4 und Sox-2 nur let7b).

Mit wenigen Ausnahmen wie der miR-200a und Molekülen der let7-Gruppe stimmen die in den genannten Veröffentlichungen als differenzierungsfördernd beschriebenen microRNAs nicht mit den in der vorliegenden Arbeit identifizierten überein. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen könnte sein, dass eine funktionale Hierarchie auf mehreren Ebenen der für das Zellschicksal bedeutsamen microRNAs existiert, die bestimmt, an welcher Stelle des Differenzierungsgeschehens eine bestimmte miR wirksam wird (siehe Abbildung 7.1). Moleküle wie miR-145 oder die miRNAs aus der let7-Gruppe beispielsweise unterbinden zunächst die Expression der Gene für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status und leiten so die allgemeine Differenzierungsbereitschaft der Zelle ein. Einige miRNAs wie -34a transformieren die Zelle anschließend in eine Vorläufer- bzw. in eine multipotente Stammzelle eines bestimmten Keimblattes (Meso-, Ekto- oder Endoderm). Moleküle wie miR-124 oder -146a bewirken abschließend die Ausdifferenzierung zu einer spezialisierten Zellart innerhalb einer Keimblattlinie wie Nerven- oder Knorpelzellen. Da die aufgeführten Publikationen zum Großteil die Wirkung von microRNAs der zweiten oder dritten Gruppe behandeln, ist nachvollziehbar, dass über die Oct-4, Sox-2 und Nanog reprimierenden RNA-Moleküle, die in dieser Arbeit betrachtet wurden, in der Literatur nur wenig berichtet wird.

Dieses Modell der funktionellen Hierarchie von differenzierungsfördernden microRNAs legt nahe, bei zukünftigen stammzelltechnologischen Experimenten mit iPSen oder nativen Stammzellen sukzessive oder gleichzeitig Moleküle aller drei Gruppen einzusetzen, um einen spezialisierten Zelltyp zu generieren.



**Abbildung 6.1** Mögliches funktionelles Hierarchie-Modell von microRNAs bei der Ausdifferenzierung von Zellen.

## 6.2 Methodik

Die im Rahmen dieser Dissertation verwandte Luminometrie-Methode für die Detektion von auf stammzelltypische Gene wirksamen microRNAs ist ein gebräuchliches und zuverlässiges Mittel für Hochdurchsatzuntersuchungen von Molekül-Zell-Wechselwirkungen. Dabei steht der Einsatz von transient in Testzellen eingebrachten Luziferasevektoren im Vordergrund (Anton et al., 2011); die hier genutzte stabile Transformation von HEK-Zellen ermöglichte eine zusätzliche Sicherheit bezüglich der Validität erhaltener Signale bei gleichzeitig moderatem zusätzlichen Arbeits- und Zeitaufwand (Gagne et al., 1994).

Das Flp/FRT-System ist ein in den letzten Jahren häufig genutztes Mittel zur ortsgerichteten

Rekombination von Vektoren mit dem Genom von Wirtszellen (Mortensen, 2006; Mishina und Sakimura, 2007; Belizário et al., 2012; Turan et al., 2013).

Die in der vorliegenden Dissertation verwandten premicroRNAs von life/Ambion besitzen nicht die Sekundärstruktur natürlicher pre-microRNAs. Die zellulären Moleküle stellen eine doppelsträngige Stammschleife dar, wohingegen das Industrieprodukt aus zwei komplementären Einzelsträngen besteht, die nur über Wasserstoffbrücken, aber nicht kovalent verbunden sind. Die Sequenzen dieser Einzelstränge sind aber identisch zur zellulären RNA. Da die Schleifenstruktur im Zuge der microRNA-Verarbeitung im Zytoplasma allerdings entfernt wird, stellt die künstliche premicroRNA ein der reifen natürlichen miRNA sehr ähnliches Molekül dar. Daher stellt das von uns genutzte Produkt einen naturidentischen validen Ersatz dar, der nach Literaturlage in mehreren Forschungsarbeiten Anwendung fand.

Die Langzeitluminometrie mit viral transfizierten NCC-IT-Oct-4-Zellen, die in Anwesenheit des Luziferase-Substrates Luziferin kultiviert wurden, ist ein erprobtes Verfahren im Rahmen einer Reporter-gen-Analyse (Zhao et al., 2007).

Die zur Invasionsanalyse von Brustkrebszellen genutzten mikrofluidischen Polymerchips entsprechen dem Lab-on-a-Chip-Prinzip, das neuartige chemische Verfahren und zelluläre Anwendungen ermöglicht (Kirby, 2010; Chen et al., 2012). Viele Forschungsanwendungen wurden mit Hilfe des mikrofluidischen Prinzips ermöglicht und durchgeführt (Wang et al., 2012; Peterson et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Produkte erlaubten die Kultivierung der Mammakarzinomzellen gleichzeitig mit der Beobachtung des Invasionsgeschehens im Matrigelfilm des Chips und boten daher einen erheblichen Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren nach Prinzip der Boyden-Kammer oder des Wundheilungs-Verfahrens. Die Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes Dy630OH ermöglichte eine zusätzliche Kontrastverstärkung der dargestellten Strukturen. Da die Zellen im Chip nicht in einer Schicht, sondern in mehreren Lagen übereinander kultiviert wurden (was der natürlichen Situation in der Patientin näher kommt), wäre ohne Fluoreszenz-Bildgebung keine gut auswertbare Datei erstellbar gewesen.

Die luminometrische Detektion von auf die Expression von Stammzellgenen wirksamen microRNAs wurde mit einer geringen Anzahl technischer Replikate ( $n = 3$ ) durchgeführt. Da Hochdurchsatzverfahren allerdings äußerst teuer und zeitaufwändig sind, mußte an dieser Stelle ein praktikabler Kompromiss gefunden werden. Da die als hochwirksam erkannten microRNAs in einem zweiten Verfahren validiert und zudem teilweise in physiologischen Experimenten weiter untersucht wurden, war die geringe Zahl der Replikate vertretbar. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, daß die in der Literatur bestens charakterisierte auf Oct-4 wirksame microRNA-145 in der in dieser Dissertation durchgeführten Hochdurchsatzanalyse bemerkenswerterweise nicht



detektiert wurde. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, daß das gewählte Verfahren die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse beinhaltet.

Auch im Rahmen der Invasions-Experimente wurde eine minimale Zahl von biologischen Replikaten ( $n = 3$ ) genutzt, da Kosten und Aufwand eine Beschränkung erforderten. Da die hier verwandten Stimulantien/miRNAs aber in den oben genannten Versuchen bereits charakterisiert wurden und zudem eine bestens beschriebene und etablierte Zelllinie (MDA-MB-231) zum Einsatz kam, ist die Beschränkung vertretbar. Die zur statistischen Auswertung herangezogene ANOVA-Methode ist zwar bei einer geringen Zahl an Replikaten nur eingeschränkt aussagekräftig; da allerdings Post-hoc-Tests (Tukey) zusätzlich durchgeführt wurden, sind die angegebenen Statistiken (mit Standardfehler) ausreichend, um eine wissenschaftlich valide Aussage zu erhalten.

## **7. Schlußfolgerungen und Ausblick**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Expression stammzelltypischer Gene durch spezifische microRNAs mit nativer Sequenz signifikant herabreguliert werden kann. Als mögliche biotechnologische Anwendung kommt der sukzessive Einsatz pluripotenzreprimierender und differenzierungsfördernder microRNAs in Frage, um natürliche oder induzierte Stammzellen gezielt zu spezifischen Gewebszellen zu transformieren. Weiterhin könnten pluripotenzreprimierende microRNAs pharmazeutisch genutzt werden, um stammzellähnliche Krebszellen auszudifferenzieren und so ihre Malignität zu vermindern.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abdullah, L.N., and Chow, E.K.-H. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine* 2, 3.
- Adammek, M., Greve, B., Kässens, N., Schneider, C., Brüggemann, K., Schüring, A.N., Starzinski-Powitz, A., Kiesel, L., and Götte, M. (2013). MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors. *Fertil. Steril.* 99, 1346–1355.e5.
- Adegani, F.J., Langroudi, L., Arefian, E., Shafiee, A., Dinarvand, P., and Soleimani, M. (2013). A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Molecular Biology Reports* 40, 3693–3703.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121, 207–221.
- Ambion, life technologies <http://de-de.invitrogen.com/site/de>.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.
- Anton, R., Chatterjee, S.S., Simundza, J., Cowin, P., and DasGupta, R. (2011). A Systematic Screen for Micro-RNAs Regulating the Canonical Wnt Pathway. *PLoS ONE* 6, e26257.
- Arpornmaeklong, P., Brown, S.E., Wang, Z., and Krebsbach, P.H. (2009). Phenotypic Characterization, Osteoblastic Differentiation, and Bone Regeneration Capacity of Human Embryonic Stem Cell–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development* 18, 955–968.
- Belizário, J.E., Akamini, P., Wolf, P., Strauss, B., and Xavier-Neto, J. (2012). New routes for transgenesis of the mouse. *J. Appl. Genet.* 53, 295–315.
- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* 40, 499–507.
- Bhinge, A., Poschmann, J., Namboori, S.C., Tian, X., Jia Hui Loh, S., Traczyk, A., Prabhakar, S., and Stanton, L.W. (2014). MiR-135b is a direct PAX6 target and specifies human neuroectoderm by inhibiting TGF- $\beta$ /BMP signaling. *The EMBO Journal*.
- Boiani, M. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes & Development* 16, 1209–1219.
- Boström, P., Söderström, M., Vahlberg, T., Söderström, K.-O., Roberts, P.J., Carpen, O., and Hirsimäki, P. (2011). MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer. *BMC Cancer* 11, 348.
- Cao, X., Luo, X., Liang, J., Zhang, C., Meng, X., and Guo, D. (2012). Critical selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies in lipopolysaccharide-stimulated human

THP-1 and K562 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 366–372.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655.

Chang, C.-C., Shieh, G.-S., Wu, P., Lin, C.-C., Shiau, A.-L., and Wu, C.-L. (2008). Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Res.* 68, 6281–6291.

Chen, J., Li, J., and Sun, Y. (2012). Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab on a Chip* 12, 1753.

Cheung, K.S.C., Sposito, N., Stumpf, P.S., Wilson, D.I., Sanchez-Elsner, T., and Oreffo, R.O.C. (2014). MicroRNA-146a Regulates Human Foetal Femur Derived Skeletal Stem Cell Differentiation by Down-Regulating SMAD2 and SMAD3. *PLoS ONE* 9, e98063.

Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P.N., and Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122, 509–520.

Cummings, B.J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 14069–14074.

Czech, M.P. (2006). MicroRNAs as Therapeutic Targets. *New England Journal of Medicine* 354, 1194–1195.

Dai, X., Ge, J., Wang, X., Qian, X., Zhang, C., and Li, X. (2013). OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncol. Rep.* 29, 155–160.

Darr, H., Mayshar, Y., and Benvenisty, N. (2006). Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133, 1193–1201.

Dohi, O., Yasui, K., Gen, Y., Takada, H., Endo, M., Tsuji, K., Konishi, C., Yamada, N., Mitsuyoshi, H., Yagi, N., et al. (2013). Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* 42, 411–418.

Domingo-Domenech, J., Vidal, S.J., Rodriguez-Bravo, V., Castillo-Martin, M., Quinn, S.A., Rodriguez-Barrueco, R., Bonal, D.M., Charytonowicz, E., Gladoun, N., de la Iglesia-Vicente, J., et al. (2012). Suppression of Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer through Depletion of Notch- and Hedgehog-Dependent Tumor-Initiating Cells. *Cancer Cell* 22, 373–388.

Duan, P., Sun, S., Li, B., Huang, C., Xu, Y., Han, X., Xing, Y., and Yan, W. (2014). miR-29a Modulates Neuronal Differentiation through Targeting REST in Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* 9, e97684.

Dyer, B.W., Ferrer, F.A., Klinedinst, D.K., and Rodriguez, R. (2000). A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal. Biochem.* 282, 158–161.

Ebrahimi, F., Gopalan, V., Smith, R.A., and Lam, A.K.-Y. (2014). miR-126 in human cancers:

clinical roles and current perspectives. *Exp. Mol. Pathol.* 96, 98–107.

Friedmann-Morvinski, D., and Verma, I.M. (2014). Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Rep.* 15, 244–253.

Gagne, D., Balaguer, P., Demirpence, E., Chabret, C., Trousse, F., Nicolas, J.C., and Pons, M. (1994). Stable luciferase transfected cells for studying steroid receptor biological activity. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 201–209.

Gaunitz, F., Papke, M., and Gebhardt, R. (1996). Transient transfection of primary cultured hepatocytes using CaPO<sub>4</sub>/DNA precipitation. *BioTechniques* 20, 826–830, 832.

Gilam, A., Edry, L., Mamluk-Morag, E., Bar-Ilan, D., Avivi, C., Golan, D., Laitman, Y., Barshack, I., Friedman, E., and Shomron, N. (2013). Involvement of IGF-1R regulation by miR-515-5p modifies breast cancer risk among BRCA1 carriers. *Breast Cancer Research and Treatment* 138, 753–760.

Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H.B., Chiocca, E.A., and Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* 68, 9125–9130.

Gould, S.J., and Subramani, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175, 5–13.

Greer Card, D.A., Hebbar, P.B., Li, L., Trotter, K.W., Komatsu, Y., Mishina, Y., and Archer, T.K. (2008). Oct4/Sox2-Regulated miR-302 Targets Cyclin D1 in Human Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* 28, 6426–6438.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631–640.

Guled, M., Lahti, L., Lindholm, P.M., Salmenkivi, K., Bagwan, I., Nicholson, A.G., and Knuutila, S. (2009). CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 615–623.

Gunaratne, P.H. (2009). Embryonic stem cell microRNAs: defining factors in induced pluripotent (iPS) and cancer (CSC) stem cells? *Curr Stem Cell Res Ther* 4, 168–177.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840.

Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 Additively Induce Krüppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597–609.

Ham, O. (2014). Upregulation of miR-23b Enhances the Autologous Therapeutic Potential for Degenerative Arthritis by Targeting PRKACB in Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells from Patients. *Molecules and Cells*.

Hampf, M., and Gossen, M. (2006). A protocol for combined Photinus and Renilla luciferase quantification compatible with protein assays. *Anal. Biochem.* 356, 94–99.

- Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development* 18, 3016–3027.
- He, W., Li, K., Wang, F., Qin, Y.-R., and Fan, Q.-X. (2012). Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *World J. Gastroenterol.* 18, 712–719.
- Heyn, H., Engelmann, M., Schreek, S., Ahrens, P., Lehmann, U., Kreipe, H., Schlegelberger, B., and Beger, C. (2011). MicroRNA miR-335 is crucial for the BRCA1 regulatory cascade in breast cancer development. *Int. J. Cancer* 129, 2797–2806.
- Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., Hein, K., Vogt, R., and Kemler, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science* 336, 1549–1554.
- Hu, B., Guo, Y., Chen, C., Li, Q., Niu, X., Guo, S., Zhang, A., Wang, Y., and Deng, Z. (2014). Repression of SIRT1 Promotes the Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells into Neural Stem Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*.
- Hu, H., Zhang, Y., Cai, X.-H., Huang, J.-F., and Cai, L. (2012a). Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. *Oncol Lett* 4, 1037–1042.
- Hu, J., Guo, H., Li, H., Liu, Y., Liu, J., Chen, L., Zhang, J., and Zhang, N. (2012b). MiR-145 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells by Targeting Oct4. *PLoS ONE* 7, e45965.
- Huang, Z.-J., Wang, R., Luo, W.-Y., Yi, W.-C., Zeng, Y.-Y., and Luo, Q. (2012). [Expression of OCT4 in gastric cancer cell lines and its significance]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 43, 812–815.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology* 26, 1269–1275.
- Jain, A.K., Allton, K., Iacovino, M., Mahen, E., Milczarek, R.J., Zwaka, T.P., Kyba, M., and Barton, M.C. (2012). p53 Regulates Cell Cycle and MicroRNAs to Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Biology* 10, e1001268.
- Jang, J.-Y., Lee, Y.-S., Jeon, Y.-K., Lee, K., Jang, J.-J., and Kim, C.-W. (2013). ANT2 suppression by shRNA restores miR-636 expression, thereby downregulating Ras and inhibiting tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Experimental & Molecular Medicine* 45, e3.
- Jiang, J., Sun, X., Wang, W., Jin, X., Bo, X., Li, Z., Bian, A., Jiu, J., Wang, X., Liu, D., et al. (2012). Tumor microRNA-335 expression is associated with poor prognosis in human glioma. *Med. Oncol.* 29, 3472–3477.
- Jong, H.-L., Mustafa, M.R., Vanhoutte, P.M., AbuBakar, S., and Wong, P.-F. (2013). MicroRNA 299-3p modulates replicative senescence in endothelial cells. *Physiol. Genomics* 45, 256–267.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119, 1420–1428.

- Kalwitz, G., Neumann, K., Ringe, J., Sezer, O., Sittering, M., Endres, M., and Kaps, C. (2011). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in micro-masses is impaired by high doses of the chemokine CXCL7. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5, 50–59.
- Kim, J., and Orkin, S.H. (2011). Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Medicine* 3, 75.
- Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araújo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrlich, M., van den Boom, D., et al. (2009). Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. *Cell* 136, 411–419.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araújo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646–650.
- Kim, V.N., and Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 22, 165–173.
- Kirby, B.J. (2010). Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics TRANSPORT IN MICROFLUIDIC DEVICES (Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi, Dubai, Tokyo: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS).
- Komitova, M., and Eriksson, P.S. (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* 369, 24–27.
- Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.-W., Chang, T.-C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., et al. (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005–1017.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2010). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* 39, D152–D157.
- Kruskal, W.H., and Wallis, W.A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47, 583.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* 438, 685–689.
- Lagos-Quintana, M. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.
- Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics* 30, 363–364.
- Langers, A.M.J., Sier, C.F.M., Hawinkels, L.J.A.C., Kubben, F.J.G.M., van Duijn, W., van der Reijden, J.J., Lamers, C.B.H.W., Hommes, D.W., and Verspaget, H.W. (2008). MMP-2 genotype is prognostic for colorectal cancer survival, whereas MMP-9 is not. *Br. J. Cancer* 98, 1820–1823.

- Lee, N.S., Kim, J.S., Cho, W.J., Lee, M.R., Steiner, R., Gompers, A., Ling, D., Zhang, J., Strom, P., Behlke, M., et al. (2008). miR-302b maintains “stemness” of human embryonal carcinoma cells by post-transcriptional regulation of Cyclin D2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 434–440.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* 21, 4663–4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23, 4051–4060.
- Lee, Y.S., and Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4, 199–227.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Lichner, Z., Páll, E., Kerekes, A., Pállinger, É., Maraghechi, P., Bősze, Z., and Gócsa, E. (2011). The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation* 81, 11–24.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
- Lin, C.-W., Liao, M.-Y., Lin, W.-W., Wang, Y.-P., Lu, T.-Y., and Wu, H.-C. (2012). Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 39449–39459.
- Lin, S.-L., and Ying, S.-Y. (2013). Mechanism and method for generating tumor-free iPS cells using intronic microRNA miR-302 induction. *Methods Mol. Biol.* 936, 295–312.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 38, 431–440.
- Lüningschrör, P., Stöcker, B., Kaltschmidt, B., and Kaltschmidt, C. (2012). miR-290 Cluster Modulates Pluripotency by Repressing Canonical NF- $\kappa$ B Signaling. *STEM CELLS* 30, 655–664.
- Luo, M., Weng, Y., Tang, J., Hu, M., Liu, Q., Jiang, F., Yang, D., Liu, C., Zhan, X., Song, P., et al. (2012). MicroRNA-450a-3p Represses Cell Proliferation and Regulates Embryo Development by Regulating Bub1 Expression in Mouse. *PLoS ONE* 7, e47914.
- Lynch, J., Fay, J., Meehan, M., Bryan, K., Watters, K.M., Murphy, D.M., and Stallings, R.L. (2012). MiRNA-335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGF- $\beta$  signalling pathway. *Carcinogenesis* 33, 976–985.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.

- Mann, H.J., and Whitney, D. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18, 50–60.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7634–7638.
- Martin, M.M., Lee, E.J., Buckenberger, J.A., Schmittgen, T.D., and Elton, T.S. (2006). MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 281, 18277–18284.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 9, 625–635.
- McMillan, M.E., Grace, A., Andronicos, N., Hinch, G., and Schmoelzl, S. (2013). 281 USE OF SMALL MOLECULES ENHANCES REPROGRAMMING SUCCESS IN BOVINE DERMAL FIBROBLASTS. *Reproduction, Fertility and Development* 25, 288.
- Medina, P.P., Nolde, M., and Slack, F.J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467, 86–90.
- Melton, C., Judson, R.L., and Blelloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621–626.
- Mishina, M., and Sakimura, K. (2007). Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. *Neurosci. Res.* 58, 105–112.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., et al. (2011). Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633–638.
- Mortensen, R. (2006). Overview of gene targeting by homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol Chapter* 23, Unit 23.1.
- Mueller, T., Luetzkendorf, J., Nerger, K., Schmoll, H.-J., and Mueller, L.P. (2009). Analysis of OCT4 expression in an extended panel of human tumor cell lines from multiple entities and in human mesenchymal stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 495–503.
- Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics* (Heidelberg: Spektrum Akad.-Verlag).
- Müller, P. (1991). *Lexikon der Stochastik* (Berlin: Akademie).
- Neo, W.H., Yap, K., Lee, S.H., Looi, L.S., Khandelia, P., Neo, S.X., V Makeyev, E., and Su, I.-H. (2014). MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *J. Biol. Chem.*
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat. Rev. Cancer* 9, 293–302.
- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., et al. (2012). c-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and



Embryonic Stem Cells. *Cell* 151, 68–79.

Noguchi, K., Gel, Y., Brunner, E., and Konietzschke, F. (2012). nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *Journal of Statistical Software* 50(12), 1–23.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* 322, 949–953.

Östling, P., Leivonen, S.-K., Aakula, A., Kohonen, P., Mäkelä, R., Hagman, Z., Edsjö, A., Kangaspeska, S., Edgren, H., Nicorici, D., et al. (2011). Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 71, 1956–1967.

Otsubo, T., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Shimada, S., Goto, K., and Yuasa, Y. (2011). MicroRNA-126 Inhibits SOX2 Expression and Contributes to Gastric Carcinogenesis. *PLoS ONE* 6, e16617.

Park, I.-H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2007). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89.

Peng, C., Li, N., Ng, Y.-K., Zhang, J., Meier, F., Theis, F.J., Merckenschlager, M., Chen, W., Wurst, W., and Prakash, N. (2012). A Unilateral Negative Feedback Loop Between miR-200 microRNAs and Sox2/E2F3 Controls Neural Progenitor Cell-Cycle Exit and Differentiation. *Journal of Neuroscience* 32, 13292–13308.

Peng, X. (2012). miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. *Oncology Reports*.

Pereira, C.F., Terranova, R., Ryan, N.K., Santos, J., Morris, K.J., Cui, W., Merckenschlager, M., and Fisher, A.G. (2008). Heterokaryon-Based Reprogramming of Human B Lymphocytes for Pluripotency Requires Oct4 but Not Sox2. *PLoS Genetics* 4, e1000170.

Peterson, V.M., Castro, C.M., Chung, J., Miller, N.C., Ullal, A.V., Castano, M.D., Penson, R.T., Lee, H., Birrer, M.J., and Weissleder, R. (2013). Ascites analysis by a microfluidic chip allows tumor-cell profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E4978–E4986.

Piccoli, S.P., Caimi, P.G., and Cole, M.D. (1984). A conserved sequence at c-myc oncogene chromosomal translocation breakpoints in plasmacytomas. *Nature* 310, 327–330.

Pinho, F.G., Frampton, A.E., Nunes, J., Krell, J., Alshaker, H., Jacob, J., Pellegrino, L., Roca-Alonso, L., de Giorgio, A., Harding, V., et al. (2013). Downregulation of microRNA-515-5p by the estrogen receptor modulates sphingosine kinase 1 and breast cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 73, 5936–5948.

Png, K.J., Yoshida, M., Zhang, X.H.-F., Shu, W., Lee, H., Rimner, A., Chan, T.A., Comen, E., Andrade, V.P., Kim, S.W., et al. (2011). MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev.* 25, 226–231.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 9, 265–273.

Raychaudhuri, M., Schuster, T., Buchner, T., Malinowsky, K., Bronger, H., Schwarz-Boeger, U., Höfler, H., and Avril, S. (2012). Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. *J Mol Diagn* 14, 376–384.

Razak, S.R.A., Ueno, K., Takayama, N., Nariai, N., Nagasaki, M., Saito, R., Koso, H., Lai, C.-Y., Murakami, M., Tsuji, K., et al. (2013). Profiling of MicroRNA in Human and Mouse ES and iPS Cells Reveals Overlapping but Distinct MicroRNA Expression Patterns. *PLoS ONE* 8, e73532.

Rehfeld, F., Rohde, A.M., Nguyen, D.T.T., and Wulczyn, F.G. (2014). Lin28 and let-7: ancient milestones on the road from pluripotency to neurogenesis. *Cell and Tissue Research*.

Scheirer, J., Ray, W.S., and Hare, N. (1976). The Analysis of Ranked Data Derived from Completely Randomized Factorial Designs. *Biometrics* 32(2), 429–434.

Schmitz, K.J., Helwig, J., Bertram, S., Sheu, S.Y., Suttorp, A.C., Seggewiss, J., Willscher, E., Walz, M.K., Worm, K., and Schmid, K.W. (2011). Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J. Clin. Pathol.* 64, 529–535.

Schoeftner, S., Scarola, M., Comisso, E., Schneider, C., and Benetti, R. (2013). An Oct4-pRb axis, controlled by MiR-335, integrates stem cell self-renewal and cell cycle control. *Stem Cells* 31, 717–728.

Sevignani, C., Calin, G.A., Siracusa, L.D., and Croce, C.M. (2006). Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mammalian Genome* 17, 189–202.

Shi, L., Jiang, D., Sun, G., Wan, Y., Zhang, S., Zeng, Y., Pan, T., and Wang, Z. (2012). miR-335 promotes cell proliferation by directly targeting Rb1 in meningiomas. *J. Neurooncol.* 110, 155–162.

Shi, W., Gerster, K., Alajez, N.M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A.B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., et al. (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res.* 71, 2926–2937.

Shu, M., Zheng, X., Wu, S., Lu, H., Leng, T., Zhu, W., Zhou, Y., Ou, Y., Lin, X., Lin, Y., et al. (2011). Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells. *Mol. Cancer* 10, 59.

Shu, M., Zhou, Y., Zhu, W., Zhang, H., Wu, S., Chen, J., and Yan, G. (2012). MicroRNA 335 is required for differentiation of malignant glioma cells induced by activation of cAMP/protein kinase A pathway. *Mol. Pharmacol.* 81, 292–298.

Sinkkonen, L., Hugenschmidt, T., Berninger, P., Gaidatzis, D., Mohn, F., Artus-Revel, C.G., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2008). MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 259–267.

Siu, A., Lee, C., Dang, D., Lee, C., and Ramos, D.M. (2012). Stem cell markers as predictors of oral cancer invasion. *Anticancer Res.* 32, 1163–1166.

- Song, W., Lu, H., Kawazoe, N., and Chen, G. (2011). Adipogenic Differentiation of Individual Mesenchymal Stem Cell on Different Geometric Micropatterns. *Langmuir* 27, 6155–6162.
- Sorrentino, A., Liu, C.-G., Addario, A., Peschle, C., Scambia, G., and Ferlini, C. (2008). Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 111, 478–486.
- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* 322, 945–949.
- Sun, M.M., Li, J.F., Guo, L.L., Xiao, H.T., Dong, L., Wang, F., Huang, F.B., Cao, D., Qin, T., Yin, X.H., et al. (2013). TGF- $\beta$ 1 suppression of microRNA-450b-5p expression: a novel mechanism for blocking myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma. *Oncogene*.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takeda, J., Seino, S., and Bell, G. (1992). Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 20, 4613–4620.
- Tanaka, K., Shimura, T., Kitajima, T., Kondo, S., Ide, S., Okugawa, Y., Saigusa, S., Toiyama, Y., Inoue, Y., Araki, T., et al. (2014). Tropomyosin-related receptor kinase B at the invasive front and tumour cell dedifferentiation in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 110, 2923–2934.
- Tavazoie, S.F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L., and Massagué, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147–152.
- Teshima, S., Shimosato, Y., Hirohashi, S., Tome, Y., Hayashi, I., Kanazawa, H., and Kakizoe, T. (1988). Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab. Invest.* 59, 328–336.
- Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tomé, M., López-Romero, P., Albo, C., Sepúlveda, J.C., Fernández-Gutiérrez, B., Dopazo, A., Bernad, A., and González, M.A. (2011). miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 18, 985–995.
- Trümbach, D., and Prakash, N. (2014). The conserved miR-8/miR-200 microRNA family and their role in invertebrate and vertebrate neurogenesis. *Cell and Tissue Research*.
- Turan, S., Zehe, C., Kuehle, J., Qiao, J., and Bode, J. (2013). Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) - a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene* 515, 1–27.
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C.M., and Hu, W.-S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 12–27.

- Vidal, S.J., Rodriguez-Bravo, V., Galsky, M., Cordon-Cardo, C., and Domingo-Domenech, J. (2013). Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene*.
- Wang, T., Zhang, Y., Huang, G., Wang, C., Xie, L., Ma, L., Li, Z., Luo, X., Tian, H., Li, Q., et al. (2012). Detect early stage lung cancer by a LAMP microfluidic chip system with a real-time fluorescent filter processor. *Science China Chemistry* 55, 508–514.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Wienholds, E., and Plasterk, R.H.A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 579, 5911–5922.
- Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1, 80–83.
- Xu, C.-X., Xu, M., Tan, L., Yang, H., Permuth-Wey, J., Kruk, P.A., Wenham, R.M., Nicosia, S.V., Lancaster, J.M., Sellers, T.A., et al. (2012a). MicroRNA miR-214 regulates ovarian cancer cell stemness by targeting p53/Nanog. *J. Biol. Chem.* 287, 34970–34978.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., and Kosik, K.S. (2009). MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 137, 647–658.
- Xu, Y., Zhao, F., Wang, Z., Song, Y., Luo, Y., Zhang, X., Jiang, L., Sun, Z., Miao, Z., and Xu, H. (2012b). MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1. *Oncogene* 31, 1398–1407.
- Yang, C.-S., Li, Z., and Rana, T.M. (2011). microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA* 17, 1451–1460.
- Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J.-J., O'Donnell, J.D., Wang, J., Wenham, R.M., Coppola, D., Kruk, P.A., Nicosia, S.V., et al. (2008). MicroRNA Expression Profiling in Human Ovarian Cancer: miR-214 Induces Cell Survival and Cisplatin Resistance by Targeting PTEN. *Cancer Research* 68, 425–433.
- Yang, L., Li, Y., Cheng, M., Huang, D., Zheng, J., Liu, B., Ling, X., Li, Q., Zhang, X., Ji, W., et al. (2012). A functional polymorphism at microRNA-629-binding site in the 3'-untranslated region of NBS1 gene confers an increased risk of lung cancer in Southern and Eastern Chinese population. *Carcinogenesis* 33, 338–347.
- Yasui, K. (2012). Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*.
- Yeh, E., Gustafson, K., and Boulianne, G.L. (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7036–7040.
- Yekta, S., Shih, I.-H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594–596.
- Yin, X., Li, Y.-W., Jin, J.-J., Zhou, Y., Ren, Z.-G., Qiu, S.-J., and Zhang, B.-H. (2013). The clinical and prognostic implications of pluripotent stem cell gene expression in hepatocellular carcinoma.

Oncol Lett 5, 1155–1162.

Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281–292.

Yu, C.-C., Chen, Y.-W., Chiou, G.-Y., Tsai, L.-L., Huang, P.-I., Chang, C.-Y., Tseng, L.-M., Chiou, S.-H., Yen, S.-H., Chou, M.-Y., et al. (2011). MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. *Oral Oncol.* 47, 202–210.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920.

Zeng, Y., Wagner, E.J., and Cullen, B.R. (2002). Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate mRNAs When Expressed in Human Cells. *Molecular Cell* 9, 1327–1333.

Zhang, J.-H. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* 4, 67–73.

Zhang, P., Andrianakos, R., Yang, Y., Liu, C., and Lu, W. (2010). Kruppel-like Factor 4 (Klf4) Prevents Embryonic Stem (ES) Cell Differentiation by Regulating Nanog Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 285, 9180–9189.

Zhang, S., Kim, K., Jin, U.H., Pfent, C., Cao, H., Amendt, B., Liu, X., Wilson-Robles, H., and Safe, S. (2012). Aryl hydrocarbon receptor agonists induce microRNA-335 expression and inhibit lung metastasis of estrogen receptor negative breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 11, 108–118.

Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 19, 1129–1133.

Zhao, W.-N., Malinin, N., Yang, F.-C., Staknis, D., Gekakis, N., Maier, B., Reischl, S., Kramer, A., and Weitz, C.J. (2007). CIPC is a mammalian circadian clock protein without invertebrate homologues. *Nature Cell Biology* 9, 268–275.

Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., and Zhang, L. (2010). Identification of MicroRNAs Regulating Reprogramming Factor LIN28 in Embryonic Stem Cells and Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 285, 41961–41971.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.

Zucker, S., and Vacirca, J. (2004). Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 101–117.

Internet-Quellen ohne Identifizierungsnummer (digital object identifier, doi):

Flp In System: For Generating Constitutive Expression Cell Lines | Life Technologies. at <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-expression-protocol/flp-in-system-for-generating-constitutive-expression-cell-lines.html#prot> (abgerufen am 05.06.2012)

Gerichtshof der Europäischen Union, PRESSEMITTEILUNG Nr. 112/11: cp110112de.pdf. at <http://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2011-10/cp110112de.pdf> (abgerufen am 10.03.2013)

Knoepffler, N, Schipanski, D, Sorgner, SL (2007). Humanbiotechnology as social challenge: an interdisciplinary introduction to bioethics (Aldershot, England ; Burlington, VT: Ashgate). <http://www.ashgate.com/isbn/9780754657552> (abgerufen am 16.11.2014)

microRNA.org. at <http://www.microrna.org/microrna/getMrna.do?gene=5460&utr=12881&organism=9606#> (abgerufen am 11.11.2012)

miRBase. at <http://www.mirbase.org/> (abgerufen am 11.11.2012)

Santa Cruz Biotechnology: sc-5279.pdf. at <http://datasheets.scbt.com/sc-5279.pdf> (abgerufen am 16.11.2014)

Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna/learning-center/mirna-introduction.html> (abgerufen am 16.11.2014)

TargetScanHuman 6.2. at <http://www.targetscan.org/> (abgerufen am 16.11.2014)

Weblogo: <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (abgerufen am 16.08.2014)

(erzeugt mit Zotero)

## 9. Anhang

### 9.1 Daten

#### 9.1.1 Klonierung

**Tabelle 9.1 3'UTR-Sequenzen der untersuchten humanen Gene (NCBI).**

3'UTR	Sequenz (5'-3')
<b>Oct-4</b>	gtactcctcggtccctttccctgagggggaagcctttccccctgtctctgtcaccactctgggctctcccatgcattcaaactgaggt gcctgcccttctaggaatgggggacagggggaggggagggagctagggaagaaaacctggagtttgccagggttttggg attaagtcttcattcactaaggaaggaattgggaacacaaaagggtgggggcaggggagttggggcaactggttgagggaag gtgaagttcaatgatgctcttgattttaatcccacatcatgtatcactttttctaaataaagaagcctgggacagtagatagacac acttatcttggttgccttcagttactgaggtggggatgggaatatccaatgctcatacccaagtgacctga
<b>Nanog</b>	gcaacctgaagacgtgtgaaccttaatgtaatacagcagaccactaggtatttttagtactccacaaacctaggatttattcctaaact actccatgaacatgcaacctgaagacgtgtgaagatgagtgaactgatattactcaatttcagctcggacactggctgaatccttc ctctcccctcctccatccctcataggattttctgttggaaaccacgtgttctggttccatgatgccatccagtcattctcatgga gggtggagtagtgggtggagcctaatacgcgaggtttcttttttttttctattggatcttctggagaaaaatactttttttttttt gaaacggagcttctctgtcgtccaggtggagtgagtggtggcggtcttggctcactgcaagctccgtctccgggttcacgc cattctctgcctcagctcccagcagctgggactacaggcgcccgccacctcggcgctaataattttagtatttttagtagagac ggggtttcactgtgttagccaggatggtctcgtatctctgacctgtgatccaccgacctcggcctccctaacagctgggatttaca ggcgtgagccaccgcgcctgctagaaaagacattttaaaccttggctgccgtctctggctatagataagtagatctaatacta gtttggatatcttagggtttagaatctaacctcaagaataagaaatacaagtacaaattgggtgatgaagatgtatctgattgttggg attgggaggtcttctatttttaaaaactattgaggtaaagggttaagctgtaacatacttaattgatttctaccgttttggctctgtt tgctatatcccctaatttgttgggtgtgctaattttagtaaaagaggtctcgtatttctgcatcgtaatgacatgagtactgcttagt ggtttaagtcaaatgaatgaacaactattttccttagttgattttaccctgatttcaccgagtggttcaatgagtaaatatacagctta aacataaatctttagtaaatgttgggtgggaggaaggaattagctgaggacactgctatcttagaaatgcatagaaatagctg agcgtggtggcctatgcgttgggtgggaggaaggaat
<b>Sox-2</b>	acactgccctctcacataaccgcccgcagcagacttcacatgtcccagcactaccagagcggcccggtgccgggcac ggccattaacggcacactgccctctcacatgtgagggccggacagcgaactggaggggggagaaaatttcaagaaaaa cgagggaaatgggaggggtgcaaaaggagagtaagaaacagcatggagaaaaccgggtacgctcaaaaagaaaaagga aaaaaaaaatccatcacccacagcaaatgacagctgcaaaagagaacaccaatccatccacactcacgcaaaaaccgcga tgccgacaagaaaactttatgagagagatcctggacttcttttggggactattttgtacagagaaaacctggggagggtggg gagggcgggggaatggacctgtatagatctggaggaaagaaagctacgaaaaacttttaaaagtctagtggtacggtagga gctttgcaggaagtttcaaaagctttaccaataatttagagctagtctccaagcgacgaaaaaatgttttaatttgaagca actttgtacagtattatcgagataaacatggcaatcaaaatgtccattgtttataagctgagaatttgccaatattttcaaggagag gcttctgtgaattttgattctgcagctgaaatttaggacagtgcaaacgtgaaaagaagaaaatttcaaatgttgacattttaatt gttataaaattgtacaaaaggaaaaaattagaataagtactggcgaaacctctgtgtgtctgttataaaagggcaaaagttaga ctgtactaaattttataacttactgttaaaagcaaaaatggccatgcagggtgacaccgttggttaattataatagcttttgtcgatecc aactttccattttgttcagataaaaaaacatgaaattactgtttgaaatattttctatggtttgtaattttctgaaatttattgtata tttaagggtttccccctttattttccgtagttgtattttaaaagattcggctctgtattttgaaatcagctcgcgagaatccatgtatat atttgaactaatatcatccttataacaggtacattttcaacttaagttttactccattatgcacagtttgagataaataattttgaaatat ggacactgaaattattcttgagtcttctatttttgataacactgtgattatacataactttcggggaattataatactgtgctcagcc aagaaagcaaaataccgtgctcagccaagaaagcaggt

<b>AGTR-1</b>	catgttcgaaacctgtccataaagtaattttgtgaaagaaggagcaagagaacattcctctgcagcacttcactaccaaatgagcat tagctacttttcagaattgaaggagaaaatgcattatgtggactgaaccgacttttctaaagctctgaacaaaagcttttcttctttg caacaagacaaaagcaaagccacattttgcattagacagatgacggctgctcgaagaacaatgtcagaaactcgatgaatgtgtg atgtgagaaattttactgacagaaatgaatctccctagcctgcttttgcctgttattttttattccacataaaggatttgaatatatta aatcgtttagaggagcaacaggagatgagagttccagattgttctgtccagtttccaaagggcagtaaaagtttctgcccgggtttca gctattagcaactgtgctacacttgacactggactgcacattttgtacaaagatatgctaagcagtagtcgtaagttgcagatctttt tgtgaaattcaacctgtgtctttaggtttccactgccccaaacaatgccgtaagatggcttattgtataatgggtgtactaaagtcac atataaaaggttaaactactgtaaaggtgctgcactggccccagtagtagtgccttctctagtataattagtttgatttaatatctgagaag tgtatatagtttgtggtaaaaagattatatatcataaagtagccttctgtttaaaaaaagtatatattctacacatatatgtatatgtatat ctatatctctaaactgctgttaattgattaaaatctggcaagttatattactttaaaaataaaataattttattgc
<b>AGTR-2</b>	acgtgagagcaaaatgcatgtaatcaacatggctacttgctttgaggctcaccagaattatttttaagtggtttaataaaaataaaa atttcccctaatttttctgaatcttctgaaaccaaataactatgtttatcgtccagtgcatttcaggaattgccattgttttctgata tgttgtacaagattgtcattagtgcacatatattacaacctagaagtaactgggtgatataatctcaaatgttaataataatagattgtga ataatgattggggattcagatttcttcttgaacatgcttgtgttcttagtgggggtttatatccattttatcaggatttctcttgaacc agaaccagtctttcaactcattgcattacattacaagacaacattgtaagagagatgagcacttctaagttgagtataattataatagatta gtactggattattcaggcttttaggcataatgcttctttaaaaaagctataaattatattcctcttgcatttcacttgagtggaggtttatagt aatctataactacataattgaatagggttaggaatatagattaaatcatactcctatgctttagcttattttacagttatagaagcaaga tgtactataacatagaattgcaatctataatattgtgtgttactaaactctgaataagcacttttaaaaaactttctactcatttaataga ttgtttaaagggtttctattttctctgatactttttgaaatcagtaaacactgtgtattgttgaataatgtaaaagtcacttttcacatcctga cttttagatgtgctgctttgatataataggacattgattgattttatttataatgctttggttctgggtgtttcctaaaatatctgggtggct taaaaaaaactctttaacttgtaataaaccttaactggcataggaaatggatccagaatggaattttgctacatgggggtctgggtg ggggcacaagagaccagtcattacatgtttgtgtaccaagaaggaacctgtcagggcagtagaatgtgactttgaaaatatata ccgtgggggtagttttacctatatctataaacactgtttgtccagaatctgtatgattctatggagctattttaaccaattgcaggtc taga

**Tabelle 9.2 Genomische humane Klone (pBACs) zur Gewinnung der 3'UTRs von Oct-4.**

Gen	Nr. imaGenes	Nr. NCBI
<b>Oct4</b>	RPCIB753N19157Q	RP11-157N19

### 9.1.2 Bindungsanalyse der miRNA-Interaktion mit Oct-4

**Tabelle 9.3 Mutierte Bindungssequenzen in der 3'UTR von Oct-4 und bindende microRNAs**

(A) DNA-Sequenzen der mutierten 3'UTRs von humanem Oct-4. Bindungsstelle der microRNA-335(-5p) ist in der Wildtypsequenz **fett** angegeben; die Stelle für die microRNA-299-3p **fett kursiv**. Die Mutationssequenz für miRNA-335(-5p) ist **fett unterstrichen**; die für miRNA-299-3p **fett unterstrichen kursiv**.



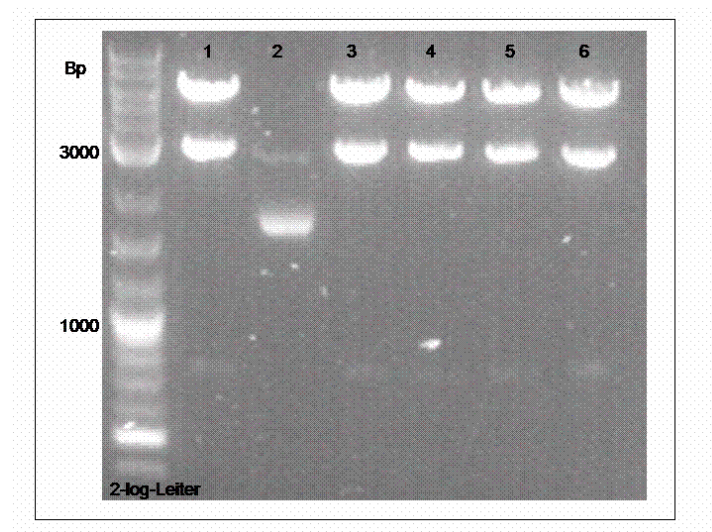
(A)

3'UTR	DNA-Sequenz (5'-3'), (www.targetscan.com)
<b>Oct-4 Wildtyp</b>	gtactcctcgggtccctttccctgagggggaagcctttccccctgtctctgtcaccactctgggctctcccatgcattcaaactgagg tgcttgccttcttaggaatgggggacagggggaggggaggagctagggaaagaaaacctggagtttgtccagggttttgg gattaagttcttcattcactaaggaaggaattgggaacacaaaggggtgggggcaggggagtttggggcaactggttgaggga aggtgaagttcaatgat <b>gctcttgatttaatcccacat</b> catgtatcactttttcttaaataaagaagcctgggacacagtagatag acacacttatcttggttgccttcagttactgaggtggggatgggaatatccaatgctcatacccaagtgacctga
<b>Oct-4 mutiert für miRNA-335</b>	gtactcctcgggtccctttccctgagggggaagcctttccccctgtctctgtcaccactctgggctctcccatgcattcaaactgagg tgcttgccttcttaggaatgggggacagggggaggggaggagctagggaaagaaaacctggagtttgtccagggttttgg gattaagttcttcattcactaaggaaggaattgggaacacaaaggggtgggggcaggggagtttggggcaactggttgaggga aggtgaagttcaatgat <b>gggcgcgcct</b> tttaatcccacatcatgtatcactttttcttaaataaagaagcctgggacacagtagata gacacacttatcttggttgccttcagttactgaggtggggatgggaatatccaatgctcatacccaagtga
<b>Oct-4 mutiert für miRNA-299-3p</b>	gtactcctcgggtccctttccctgagggggaagcctttccccctgtctctgtcaccactctgggctctcccatgcattcaaactgagg tgcttgccttcttaggaatgggggacagggggaggggaggagctagggaaagaaaacctggagtttgtccagggttttgg gattaagttcttcattcactaaggaaggaattgggaacacaaaggggtgggggcaggggagtttggggcaactggttgaggga aggtgaagttcaatgatgctcttgatttaat <b>cgga</b> ccatgtatcactttttcttaaataaagaagcctgggacacagtagatagac acacttatcttggttgccttcagttactgaggtggggatgggaatatccaatgctcatacccaagtgacctga

(B) Außerdem die nativen reifen Sequenzen der microRNAs-335-5p und -299-3p einschließlich mit der mRNA von Oct-4 hybridisierender Nukleotide.

(B)

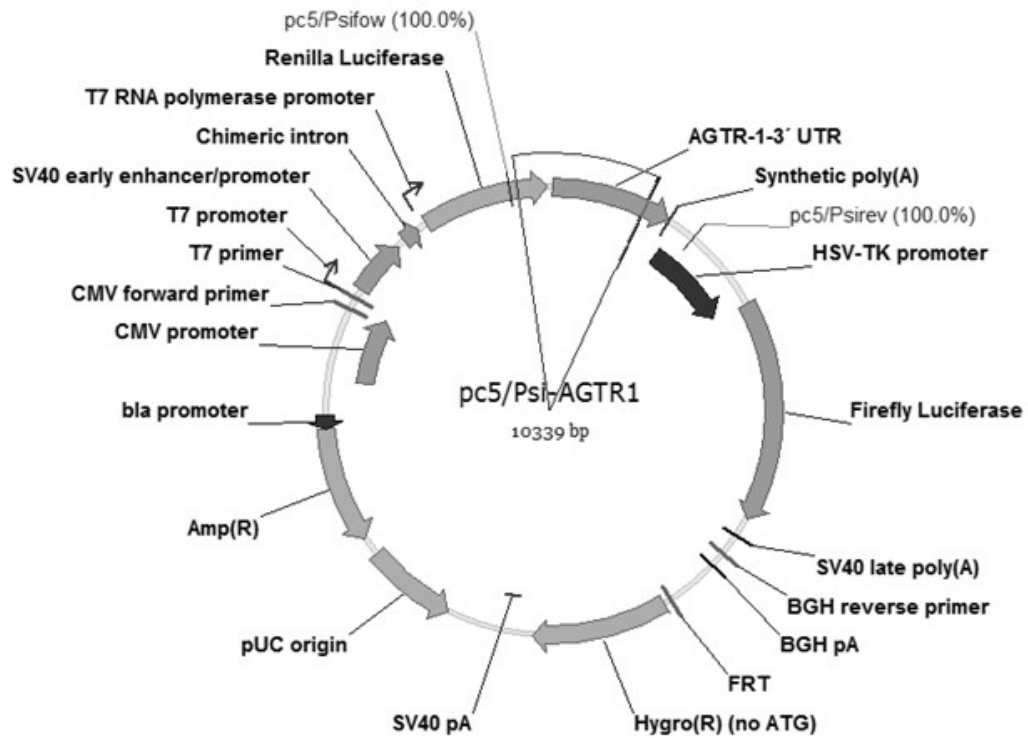
	reife native Sequenzen der microRNAs und der Oct4-mRNA ( <a href="http://www.microRNA.org">http://www.microRNA.org</a> , <a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a> )	Richtung
<b>microRNA-335-5p</b>	uguaaaaagcaauaac <u>gagaacu</u>	(3'-5')
<b>mRNA von Oct-4, 3'UTR-Bindungsstelle, <u>Pos. 185-191</u></b>	...gugaaguucaaugau <u>gcucuuga</u> ...	(5'-3')
<b>microRNA-299-3p</b>	uucgccaaaugguaggguguau	(3'-5')
<b>mRNA von Oct-4, 3'UTR-Bindungsstelle, <u>Pos. 200-206</u></b>	...gcucuugauuuuaau-- <u>cccacau</u> c...	(5'-3')
informatisch vorhergesagte hybridisierende Nukleotide <u>unterstrichen</u>		



**Abbildung 9.1 Nachweis des Grundvektors pc5/Psi.**

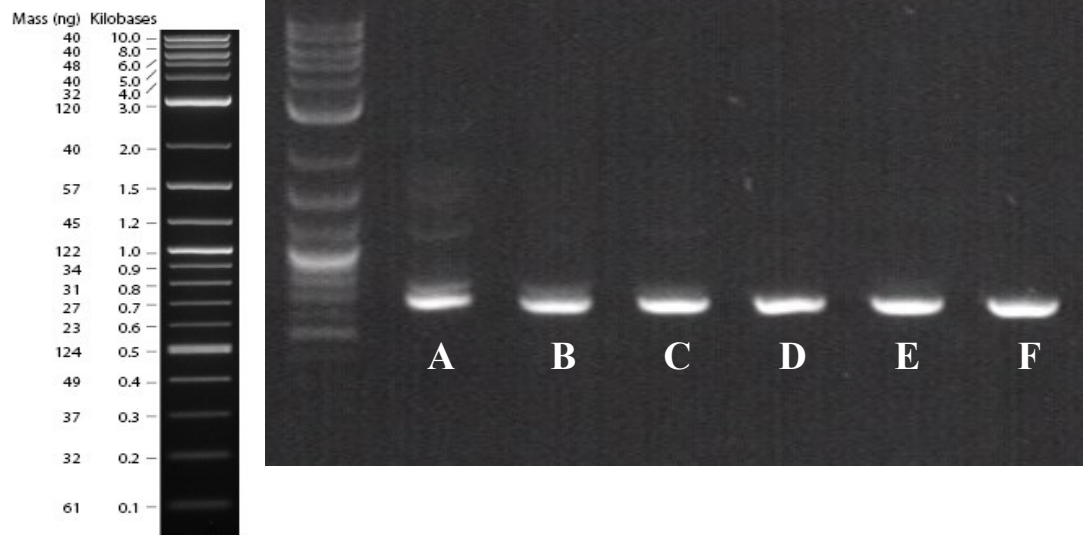
Der diagnostische Restriktionsverdau sollte Banden bei 5.821, 2.915 und 725 Bp liefern. Positionen 1-6: sechs verschiedene Klone; 1,3-6 besitzen die gewünschte Vektorsequenz.

1



2

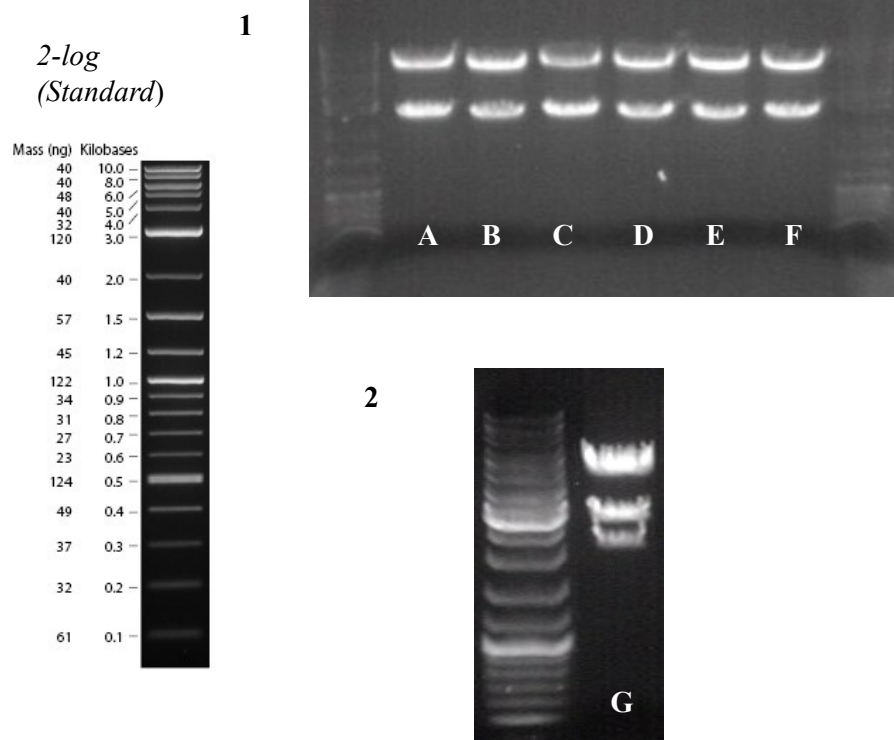
*2-log (Standard)*



**Abbildung 9.2 Nachweis der erfolgreichen genomischen Integration der pc5/Psi-Vektoren mit der jeweiligen 3'UTR, am Beispiel der Zelllinie Flp-In-pc5/Psi-AGTR1.**

A: Sequenzierung mit den Primern pc5/Psifow und -rev2. Der markierte Bereich zeigt die Übereinstimmung mit den theoretischen Daten aus VectorNTI.

B: Gradienten-PCR, Primerpaar AGTR1, HSVRück, erwartete Produktlänge 667 Bp. A-F: Banden bei Hybridisierungstemperaturen 56, 58, 60, 62, 64, und 66°



**Abbildung 9.3 Nachweis der Sequenzmutierung in den Vektoren für die Bindungsanalyse.**

A: Nachweis des Vektors mit der der mutierten 3'UTR von Oct-4 für die Analyse des Hybridisierungsstellen der miRNA-335. Der diagnostische Restriktionsverdau (AscI und BspDI) sollte Banden bei 6.921 und 2.923 Bp liefern. Positionen a-f: sechs verschiedene Klone; alle besitzen die gewünschte Vektorsequenz.

B: Nachweis des Vektors mit der der mutierten 3'UTR von Oct-4 für die Analyse der Hybridisierungsstelle der miRNA-299-3p. Der Verdau (BamHI und Sall) sollte Banden bei 4814, 2870 und 2188 Bp liefern. Der dargestellte Klon g besitzt die gewünschte Vektorsequenz.

**Tabelle 9.4 Intronüberspannende Primer für qRT-PCR zur Überprüfung der Oct-4-Expression in menschlichen Zelllinien.**

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	(°C) Hybridisierungstemperatur
Oct-4	Primer vorwärts	TCTTCAGGAGATATGCAAAGCAGA	60
	Primer rückwärts	ATCTGCTGCAGTGTGGGTTT	60
PGK1	Primer vorwärts	TCGTTGACCGAATCACCGAC	60
	Primer rückwärts	ACAGAACATCCTTGCCCAGC	60

**Tabelle 9.5 Ergebnisse der qRT-PCR zur Überprüfung der Oct-4-Expression in menschlichen Zelllinien.**

Auswertung nach  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Pro biologischem Replikat wurden drei technische Replikate angesetzt. Die NCC-IT-Oct-4-Zellen transkribieren in bezug auf die interne Kontrolle PGK-1 am meisten Oct-4; die MDA-MB-231-Zellen am wenigsten.

<b>Gen</b>	<b>Oct-4</b>			<b>PGK-1</b>		
<b>Zelllinie/Replikat</b>	<b>Hek293-1</b>	<b>Hek293-2</b>	<b>Hek293-2</b>	<b>Hek293-1</b>	<b>Hek293-2</b>	<b>Hek293-2</b>
<b>Schwellenwertzyklus, MW jeweils</b>	29,54	29,59	29,58	22,62	22,4	23,00
	<b>Hek293</b>			<b>Hek293</b>		
<b>Schwellenwertzyklus, MW gesamt</b>	29,57			22,67		
<b>Zelllinie/Replikat</b>	<b>MDA-MB-231-1</b>	<b>MDA-MB-231-2</b>	<b>MDA-MB-231-3</b>	<b>MDA-MB-231-1</b>	<b>MDA-MB-231-2</b>	<b>MDA-MB-231-3</b>
<b>Schwellenwertzyklus, MW jeweils</b>	34,54	34,01	30,11	20,85	21,03	20,89
	<b>MDA-MB-231</b>			<b>MDA-MB-231</b>		
<b>Schwellenwertzyklus, MW gesamt</b>	32,89			20,93		
<b>Zelllinie/Replikat</b>	<b>NCC-IT-Oct-4-1</b>	<b>NCC-IT-Oct-4-2</b>	<b>NCC-IT-Oct-4-3</b>	<b>NCC-IT-Oct-4-1</b>	<b>NCC-IT-Oct-4-2</b>	<b>NCC-IT-Oct-4-3</b>
<b>Schwellenwertzyklus, MW jeweils</b>	20,46	19,2	21,33	22,58	22,4	24,37
	<b>NCC-IT-Oct-4</b>			<b>NCC-IT-Oct-4</b>		
<b>Schwellenwertzyklus, MW gesamt</b>	20,33			23,11		
	<b>HEK293</b>	<b>MDA-MB-231</b>	<b>NCC-IT-OCT-4</b>	C <sub>T</sub> -Werte bezogen auf 10 ng Gesamt-cDNA pro technischem Replikat (Einzel-PCR-Ansatz)		
<b>deltaC<sub>T</sub> (Differenz MW Schwellenwertzyklus Oct-4 - PGK-1)</b>	6,9	11,96	-2,78			

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Biogenese der microRNA.

Abbildung 2.2 Vergleich zwischen Flp/FRT- und Cre/loxP-System.

Abbildung 2.3 Ablaufschema der experimentellen Untersuchungen von der Klonierung der 3'UTR-tragenden Vektoren bis zum luminometrischen Hochdurchsatzverfahren.

Abbildung 4.1 Karten der Vektoren zur stabilen Transfektion der Testzellen: das Grundplasmid (pc5/Psi) zum Einbau der jeweiligen 3'UTR und seine beiden Ausgangsvektoren (mit zusätzlich einklonierter MCS, multiple cloning site).

Abbildung 4.2 Übersicht der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Reporter-gen-3'UTR-Vektoren.

Abbildung 4.3 Das Flp-In-System nach Protokoll von life-technologies/ Invitrogen.

Abbildung 4.4 Symbolische Darstellung des integrierten Vektors pc5/Psi mit jeweiliger 3'UTR im Genom der Flp-In-HEK293-Zellen.

Abbildung 4.5 Luminometrisches Reporter-gen-verfahren: günstiges (A) gegenüber ungünstigem (B) Signal-Hintergrund-Verhältnis.

Abbildung 4.6 Luziferase-Reaktion im Luminometer: symbolische Darstellung einer Reaktionskurve.

Abbildung 4.7: Bioinformatisch vorhergesagte Bindungsstellen von microRNAs: Lage der Bindungsorte der miR-335 und -299-3p auf dem Gen von Oct-4 und mutierte Teilsequenz.

Abbildung 4.8 Prinzip des physiologischen luminometrischen Reporterassays.

Abbildung 5.1 Effizienz der Transfektion mit Alexa555-gekoppelter RNA.

Abbildung 5.2 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1.

Abbildung 5.3 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1.

Abbildung 5.4 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1 in frischen und einmal gefrorenen Ansätzen.

Abbildung 5.5 Strenge Monotonie der Verdünnungskurven in doppelt-logarithmischer Darstellung am Beispiel der Zelllinie HEK293/Flp-In mit AGTR-1-3'UTR .

Abbildung 5.6 Interaktion der microRNA-155 mit der 3'UTR von AGTR-1 in maschinell eingesäten Zellen.

Abbildung 5.7 Enzymkinetische Kurven aus den gemittelten Messwerte der Firefly- (A) und der Renilla-Luziferase (B).

Abbildung 5.8 Fluorometrische und gelelektrophoretische Analyse der premiRNA-155 aus der miRNA-Bibliothek.

Abbildung 5.9 A+B: Validierte mit den stammzelltypischen Genen wechselwirkende premicroRNAs.

Abbildung 5.10: Evolutionäre Konservierung der microRNA-Hybridisierungsstellen im Oct-4-Gen in der Analyse des UCSC-Alignment-Programmes (Algorithmus *hg18*).

Abbildung 5.11 Überprüfung der Hybridisierungsanalyse.

Abbildung 5.12 Detektion der Interaktion von microRNA-335 und -299-3p im physiologischen Reportersystem.

Abbildung 5.13 Invasionsassay: invadierende Brustkrebszellen nach Stimulation mit microRNAs.

Abbildung 5.14 Invasionsassay: Summen der Längen der Invasionsereignisse in  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 5.15 Invasionsassay: Zahl der Invasionsereignisse.

Abbildung 5.16 Invasionsassay: Verzweigungsstatistik der Invasionsereignisse.

Abbildung 5.17 Proteinblot: Detektion des Transkriptionsfaktors Oct-4 in mit microRNA-335, -299-3p und -Negativkontrolle transfizierten NCC-IT-Oct4-Zellen.

Abbildung 6.1 Mögliches funktionelles Hierarchie-Modell von microRNAs bei der Ausdifferenzierung von Zellen.

Abbildung 9.1 Nachweis des Grundvektors pc5/Psi.

Abbildung 9.2 Nachweis der erfolgreichen genomischen Integration der pc5/Psi-Vektoren mit der jeweiligen 3'UTR, am Beispiel der Zelllinie Flp-In-pc5/Psi-AGTR1.

Abbildung 9.3 Nachweis der Sequenzmutierung in den Vektoren für die Bindungsanalyse.

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 Adapter-Oligonukleotide zum Einbau von Restriktionsschnittstellen in Ausgangsplasmide.

Tabelle 4.2 Primersequenzen für die PCR zur Gewinnung der 3'UTR von Oct-4, Nanog und Sox-2.

Tabelle 4.3 Parameter der PCR zur Gewinnung der Stammzellgen-3'UTR-Sequenzen.

Tabelle 4.4 Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der Identität der 3'UTR-tragenden Vektoren.

Tabelle 4.5 Primersequenzen für die PCR zum Nachweis der Transgene in HEK293-Flp-In-Zellen.

Tabelle 4.6 Parameter der PCR zum Nachweis der Transgene in HEK293-Zellen.

Tabelle 4.7 Herstellungsprotokoll D-Luziferin-Substratpufferlösung für Firefly.

Tabelle 4.8 Herstellungsprotokoll Coelenterazin-Substratpufferlösung für Renilla.

Tabelle 4.9 Ansatz und Programm der cDNA-Synthese und der quantitativen RT-PCR.

Tabelle 4.10 Herstellungsprotokoll für Polyacrylamidgele zur elektrophoretischen Proteinauftrennung.

Tabelle 5.1 Mutierte Sequenzen in der 3'UTR von Oct-4. Hybridisierungsstelle bioinformatisch ermittelt.

Tabelle 9.1 3'UTR-Sequenzen der untersuchten humanen Gene (NCBI).

Tabelle 9.2 Genomische humane Klone (pBACs) zur Gewinnung der 3'UTRs von Oct-4.

Tabelle 9.3 Mutierte Bindungssequenzen in der 3'UTR von Oct-4 und bindende microRNAs.

Tabelle 9.4 Intronüberspannende Primer für qRT-PCR zur Überprüfung der Oct-4-Expression in menschlichen Zelllinien.

Tabelle 9.5 Ergebnisse der qRT-PCR zur Überprüfung der Oct-4-Expression in menschlichen Zelllinien.

## 9.4 Danksagungen

Nach einiger Zeit intensiver Arbeit liegt sie nun vor Ihnen: meine Dissertation. Damit ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Professoren verpflichtet. Als Doktorvater hat mich Herr Prof. Dr. med. Ralf Mrowka stets mit methodischer Expertise, Anregungen und Kritik unterstützt. Ohne seinen wertvollen akademischen Rat wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Gunter Wolf für die Gelegenheit der Durchführung meiner Dissertation in der Klinik für Innere Medizin III.

Herrn Dr. Kai Albring vom Institut für Biochemie II des Universitätsklinikums Jena danke ich für seine essentielle Hilfe bei dem luminometrischen Hochdurchsatzassay, ohne die das Verfahren nicht in der effizienten Weise hätte durchgeführt werden können. Herrn Dr. Joachim Clement von der Internistischen Onkologie des Universitätsklinikums Jena und seinem Team danke ich für die äußerst wertvollen Ratschläge zur Genexpression in Krebszellen und die exzellente Unterstützung bei der Entwicklung der Invasionsmethodik.

Herrn Prof. Dr. Thomas Zimmer, Frau Karin Schoknecht und Herrn Prof. Dr. Otmar Huber bin ich zu großem Dank verpflichtet für das Angebot, Arbeitsplatz, Chemikalien und Geräte während des Umzugs unserer Arbeitsgruppe zu nutzen, da Laborarbeiten lange Zeit sonst nicht möglich gewesen wären.



Mein Dank geht außerdem an die Kolleginnen Dr. Myangantsetseq Batdorj, Dr. Stefanie Reuter, Kristina Herold und Silke Noßmann für die Herstellung von lentiviral transfizierten Zellen für den Langzeit-Luziferase-Assay und weitere labortechnische Untersuchungen.

Ebenso geht mein Dank an meine ehemaligen Kommilitonen und Kollegen, die mich in den vergangenen Jahren mit bereichernden Tipps und Diskussionsbeiträgen wiederholt in neue thematische Bahnen gelenkt haben; vor allem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Biskup, Herrn PD Dr. Christian Melle, Frau Dr. Birgit Hoffmann, Frau Franziska Förtsch, Herrn Rainer Strathausen, Frau Teresa Langenstück und Frau Annett Wiesenburg bedanken.

Herrn Dr. Xinlai Cheng vom Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Pharmazeutische Biologie (Prof. Stefan Wölfl) der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg möchte ich herzlich für seine Unterstützung bei der Anfertigung des Proteinblots danken.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Rolf Thrum aus Berlin für seine intensive Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse meiner Doktorarbeit.

## **9.5 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Ralf Mrowka,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und

dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 30.01.2015, \_\_\_\_\_